

TRABAJO FINAL DE GRADO

Facultad de Farmacia

Universidad de Barcelona

Posibles reservorios salvajes de *Leishmania infantum* en la Cuenca del Mediterráneo

Ámbito principal: Parasitología

Ámbitos secundarios: Salud Pública y Biología Molecular

Iván Chicharro Vázquez

JUNIO 2013



Esta obra está sujeta a
una [Licencia Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

ÍNDICE

	4
Summary	5
Resumen	6
Justificación	6
1.- Introducción	
1.1.- Generalidades	7
1.2.- Leishmaniosis: Magnitud del problema	7
1.3.- El parásito	9
1.4.- Ciclo biológico	10
1.5.- Especies y distribución mundial de <i>Leishmania</i>	11
1.6.- Leishmaniosis en la Cuenca del Mediterráneo	12
1.7.- Diagnóstico de leishmaniosis	12
2.- Objetivos y plan de trabajo	13
3.- Material y métodos	
3.1.- Parte teórica	13
3.2.- Parte práctica	14
3.2.1.- Material	14
3.2.2.- Métodos	16
3.2.2.1.- Extracción de ADN	16
3.2.2.2.- PCR a tiempo real	17
4.- Resultados de la parte teórica	
4.1.- <i>Vulpes vulpes</i>	19
4.2.- <i>Canis lupus</i> y <i>C. aureus</i>	21
4.3.- <i>Martes</i> spp, <i>Genetta</i> spp y <i>Mustela</i> spp	22
4.4.- <i>Lepus granatensis</i>	23
4.5.- Gatos domésticos y salvajes	24
4.6.- Conejos salvajes	25
4.7.- Roedores	26
5.- Resultados de la parte práctica	29
6.- Discusión	30
7.- Conclusión	32
8.- Bibliografía	34
9.- Anexo: Fotografías de las diferentes especies estudiadas	
9.1.- Parte teórica	39
9.2.- Parte práctica	41

SUMMARY

Leishmania infantum is the main specie responsible for visceral and cutaneous leishmaniasis in European countries of the Mediterranean Basin. The main vectors of *L. infantum* are *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus* while dogs are the natural reservoir of this parasite. The disease is widely distributed in endemic foci where wild-life animal may become reservoirs of the disease. We made bibliographic research in order to find studies in which the infection of wild animals like rats, rabbits, red foxes, wolves, domestic and wild cats, common genet and weasels, hares, among others, was detected. The review indicates these animals may have a role as secondary reservoirs in certain endemic foci and it also indicates that some infected animals may serve as accidental hosts within the cycle. Even though there are more studies to determine the existence of other reservoirs, we can conclude that little is known about the actual role of wild and domestic animals in the eco-epidemiological life cycle in different endemic focus.

Our bibliographic research has been completed with experimental laboratory work in order to bring own data about possible parasitized animals from different areas of Catalonia. *Leishmania* DNA has been detected in liver, spleen and in some cases skin (ear) using molecular biology techniques (real time PCR) in different wild animals (*Vulpes vulpes*, *Meles meles*, *Martes foina*, *Mustela vison*, *Felis silvestris*, *Felis catus* and *Sciurus vulgaris*) captured in different areas of Catalonia. The results has permitted us to identify 7 positive cases within 52 studied animals (13.5%, 95% CI 5.59 to 25.79%). Positive samples belonged to liver and spleen of two *M. foina*, *M. vison*, *F. catus* (carnivores) and three *S. vulgaris* (rodents), all of them with very low parasite loads. *Leishmania* DNA could not be detected in any of the 8 skin samples studied; all of them belonged to *S. vulgaris*. These results indicate that the studied animals may have a role as wild reservoirs that should be studied further.

RESUMEN

Leishmania infantum es la principal especie responsable de la leishmaniosis visceral y cutánea en los países europeos de la cuenca mediterránea. *L. infantum* presenta como vectores las especies *Phlebotomus ariasi* y *P. perniciosus* y como reservorio principal el perro. La amplia distribución geográfica de la enfermedad en focos endémicos puede facilitar que otras especies animales desempeñen un papel más o menos relevante como reservorios de la enfermedad. Por ello, se realiza una revisión bibliográfica para conocer estudios dirigidos a la detección de infección en diversos animales silvestres como ratas, conejos, zorros, lobos, gatos domésticos y salvajes, jinetas, comadreja y liebres, entre otros. La revisión realizada indica que estos animales podrían tener un papel como reservorios secundarios en ciertos focos endémicos. También, se indica que ciertos animales infectados pueden actuar como hospedadores accidentales dentro del ciclo. Sin embargo, a pesar de los estudios realizados para determinar la existencia de otros reservorios de la enfermedad, se desprende de la revisión que se conoce poco sobre el papel real que, los animales silvestres y domésticos, ejercen dentro del ciclo eco-epidemiológico en los distintos focos endémicos y que son precisos nuevos esfuerzos en este campo.

El trabajo de revisión bibliográfica se completa con una parte experimental de laboratorio para aportar datos propios de posibles animales parasitados de distintas zonas de Cataluña. Para ello, se detecta la presencia de ADN de *Leishmania* en hígado, bazo y en algunos casos piel (oreja) mediante técnicas de biología molecular (PCR a tiempo real) en diferentes animales silvestres (*Vulpes vulpes*, *Meles meles*, *Martes foina*, *Mustela vison*, *Felis silvestris*, *Felis catus* y *Sciurus vulgaris*) recolectados en distintas zonas de Cataluña. Los resultados nos permiten identificar 7 animales positivos de los 52 estudiados (13,5%, IC 95% 5,59-25,79%). Las muestras positivas fueron de hígado y bazo de 2 *M. foina*, 1 *M. vison*, 1 *F. catus* (carnívoros) y 3 de *S. vulgaris* (roedores), todas ellas con cargas parasitarias muy bajas. En ninguna de las 8 muestras de piel estudiadas, todas ellas de *S. vulgaris*, pudo detectarse ADN de *Leishmania*. Estos resultados indican que estos animales podrían tener un papel como reservorios selváticos que debe ser estudiado con más profundidad.

JUSTIFICACIÓN

En este Trabajo de final de Grado un objetivo importante es la integración de tres ámbitos tratados durante el Grado de Farmacia: Parasitología, Salud Pública y Biología Molecular.

El ámbito principal es la Parasitología ya que se hace un estudio de los posibles reservorios silvestres del protozoo parásito *Leishmania infantum*, alternativos al ya conocido reservorio canino en la Cuenca del Mediterráneo. En un primer momento se describe la especie responsable, morfología, su ciclo biológico y su distribución geográfica, para posteriormente incidir en los datos sobre los animales detectados como infectados y que pueden tener un papel mayor o menor como reservorios del parásito.

Este tema tiene una gran implicación en el ámbito de la Salud Pública ya que es una enfermedad que está ampliamente distribuida por el mundo y hay millones de casos registrados y nuevos que van apareciendo a lo largo de los años. La especie *L. infantum*, de distribución mediterránea, es el agente causal de la patología cutánea y visceral en el hombre y el reservorio canino en nuestros focos endémicos. La importancia de la enfermedad en nuestra zona se refleja en un gran número de casos reconocidos por médicos, fundamentalmente dermatólogos, y veterinarios.

Por último, los estudios realizados precisan abordar el ámbito de la Bioquímica y Biología Molecular ya que mediante técnicas moleculares de estudio del ADN básicamente por técnicas de PCR, junto con técnicas tipo ELISA, permiten conseguir resultados diagnósticos más fiables y precisos, y llegar a la tipación del parásito a nivel intraespecífico, para poder llegar a conclusiones válidas del papel de reservorio de las nuevas especies estudiadas.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades

Se conoce como leishmaniosis a un conjunto de enfermedades producidas por diversas especies del género *Leishmania*. Se considera que al menos 20 especies son responsables de las distintas formas clínicas con que puede presentarse la enfermedad: cutánea (localizada o difusa), mucocutánea y visceral (1).

El género *Leishmania* se clasifica taxonómicamente como (2):

- **Phylum:** Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963).
- **Subphylum:** Mastigophora (Diesing, 1866).
- **Clase:** Zoomastigophorea (Calkins, 1909).
- **Orden:** Kinetoplastida (Vickerman, 1976).
- **Suborden:** Trypanosomatina (Kent, 1880).
- **Familia:** Trypanosomatidae (Gobben, 1905).
- **Género:** *Leishmania* (Ross, 1903).

La enfermedad es transmitida por un vector de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. El parásito se transmite a los seres humanos mediante la picadura de los flebótomos que previamente se han alimentado de un hospedador vertebrado infectado. Diferentes mamíferos pueden actuar como reservorios: roedores, cánidos y primates entre otros (3).

1.2.- Leishmaniosis: Magnitud del problema

Informes de la Organización Mundial de la Salud indican que la leishmaniosis es endémica en 88 países del mundo, considerando 350 millones de personas con riesgo de contraer dicha enfermedad. Según las estimaciones, hay 14 millones de personas infectadas y cada año se registran aproximadamente 2 millones de nuevos casos (datos fechados el día 11 de mayo del año 2006) (4).

Las epidemias de leishmaniosis han retrasado considerablemente la ejecución de numerosos programas de desarrollo, en particular en la cuenca del Amazonas, las

regiones tropicales de los países andinos, Marruecos y Arabia Saudí. La enfermedad se ha convertido así en un grave obstáculo para el desarrollo socioeconómico. Hasta hace poco, el impacto en la salud pública de la leishmaniosis fue subestimado. Durante los últimos años, las regiones endémicas se han extendido y se ha producido un fuerte incremento en el número de casos registrados de la enfermedad. Además, se considera que un número importante de casos no se registran debido a que la notificación de la enfermedad sólo es obligatoria en 32 de los 88 países afectados. Se estima que se producen cada año unos 2 millones de casos nuevos: 1,5 millones de leishmaniosis cutánea y 500000 de leishmaniosis visceral (4) (Figura 1 y Figura 2).

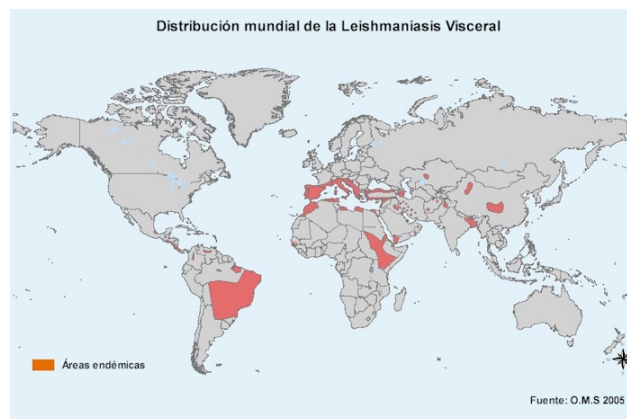


Figura 1: Distribución de la leishmaniosis visceral en el mundo. Las áreas afectadas se muestran marcadas en rojo (4)



Figura 2: Distribución de la leishmaniosis cutánea en el mundo. Las áreas afectadas se muestran marcadas en rojo (4)

La leishmaniosis visceral (kala-azar) es la forma más severa donde los amastigotes se encuentran dentro de macrófagos en diferentes órganos del sistema mononuclear fagocítico. Suele cursar con esplenomegalia y hepatomegalia. También puede haber pérdida de peso, anemia y caquexia. La leucopenia es causada por la destrucción de las células de defensa, a su vez que se reporta anemia a largo plazo. La incubación dura unos 2 meses, aunque puede prolongarse hasta los 2 años. El cuadro se va agravando, y

si no es diagnosticado y tratado oportunamente, el 90% de los casos acaban en muerte. En cambio, si es diagnosticado y tratado, la mortalidad disminuye.

La leishmaniosis cutánea suele ser benigna y a menudo autocurativa dependiendo de las especies. Se generan lesiones ulceradas o nódulos de bordes indurados, de fondos limpios e indoloros, debidas a la invasión que produce el parásito sobre los macrófagos de la piel alrededor de la picadura, con un periodo de incubación que va desde las dos semanas hasta varios meses, las lesiones pueden ser únicas o múltiples.

La leishmaniosis mucocutánea es otra manifestación clínica que se caracteriza por la presencia de lesiones mucosas consecuencia de la diseminación linfática o hematogena. Los síntomas son epistaxis, eritema y edema de la mucosa basal seguido de una progresiva destrucción ulcerativa de la zona naso-orofaríngea cuando la afectación es a nivel nasal (5).

1.3.- El parásito

El género *Leishmania* posee dos formas o estadios de desarrollo en su ciclo de vida. La forma **amastigota**, única forma que se desarrolla y multiplica en el vertebrado, en el interior de macrófagos (Figura 3). Muestra una estructura muy simple, ovalada de 3 a 5 μm de diámetro, posee membrana y un gran núcleo localizado en un extremo, aunque en ocasiones se encuentra en la parte central. Se distingue muy bien en el microscopio el núcleo y un corpúsculo baciliforme, que corresponde al kinetonúcleo.

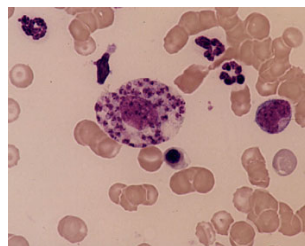


Figura 3: Formas amastigotas de *Leishmania* sp. (Fuente: *Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern*. www.dpd.cdc.gov/dpdx/)

La segunda forma es la **promastigota**, que se localiza y desarrolla en el intestino del flebótomo (huésped invertebrado) y cuando es cultivado *in vitro* (Figura 4). Tiene un aspecto fusiforme de 7 a 15 μm de longitud. El flagelo es perceptible en fresco, en cambio cuando se realiza una tinción se puede observar el núcleo, el kinetonúcleo prenuclear, además del flagelo (3, 5).

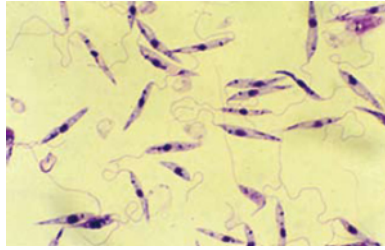


Figura 4: Formas promastigotas de *Leishmania sp.* (Fuente: *Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern*. www.dpd.cdc.gov/dpdx/)

1.4.- Ciclo biológico

Las formas amastigotas ingeridas por las hembras de flebótomos, se multiplican en la fase inicial de su llegada al tubo digestivo. Pasarán a la forma promastigota, multiplicándose en la luz del estómago e intestino del invertebrado, dando origen a unas nuevas formas promastigotas (promastigotas metacíclicas) que son las que llegan al hospedador vertebrado mediante la picadura del vector. Son rápidamente fagocitadas por células del sistema mononuclear fagocítico. El fagosoma formado se fusiona con los lisosomas del macrófago originando la vacuola parasitófora o fagolisosómica, donde el parásito se diferencia a forma amastigota y se multiplicará por divisiones binarias, hasta que son liberados. Serán captados nuevamente por macrófagos donde continuarán su evolución. Finalmente, la sangre con las formas amastigotas serán transferidas al vector cuando se alimenta del hospedador infectado (3) (Figura 5).

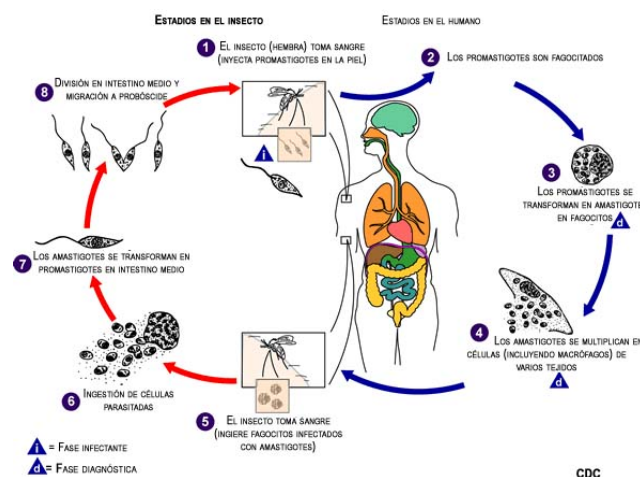


Figura 5: Ciclo biológico de *Leishmania sp.* (Fuente: *Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern*. www.dpd.cdc.gov/dpdx/)

1.5.- Especies y distribución mundial de la leishmaniosis

La identificación de las especies de *Leishmania* ha estado clásicamente basada en el cuadro clínico provocado, su distribución geográfica, desarrollo en el vector y en el comportamiento en el laboratorio al ser cultivado el material biológico o inoculado a animales de experimentación. En la actualidad, se utilizan otros criterios biológicos, inmunológicos, bioquímicos y moleculares. En la Tabla 1 se indican las principales especies de *Leishmania* capaces de causar patología en el hombre indicando la clínica que causan, su ciclo zoonótico o antroponótico y su distribución geográfica (6).

La leishmaniosis visceral es causado en su mayoría por *L. donovani*, *L. infantum*/*L. chagasi*. Las principales especies responsables de la leishmaniosis cutánea son *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y *L. infantum* en los países mediterráneos. Por último, la leishmaniosis mucocutánea, está principalmente asociada al subgénero *Viannia*, que es propia de América del Sur y Central, causada fundamentalmente *L. braziliensis* y *L. peruviana*.

	Main clinical pathology	Transmission cycle	Main geographical distribution
New World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LCL, mucosal	Zoonotic	South America, parts of Central America, Mexico
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LCL, mucosal	Zoonotic	Northern South America and southern Central America
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LCL	Zoonotic	Peru
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L. (Viannia) colombiense</i>	LCL	Zoonotic	Northern South America
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, DCL	Zoonotic	South America
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LCL, DCL	Zoonotic	Central America, Mexico, USA
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	Zoonotic	South America
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	Zoonotic	Northern South America
<i>L. (Leishmania) ganhami</i>	LCL	Zoonotic	South America
Old World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LCL, DCL	Zoonotic	Ethiopia, Kenya
<i>L. (Leishmania) killicki</i>	LCL	Zoonotic	North Africa
<i>L. (Leishmania) major</i>	LCL	Zoonotic	Central Asia, north Africa, middle east, East Africa
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LCL	Anthroponotic	Central Asia, middle east, parts of north Africa, southeast Asia
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	Visceral, LCL	Anthroponotic	Africa, central Asia, southeast Asia
Old and New World <i>Leishmania</i> spp			
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	Visceral, LCL	Zoonotic	Europe, north Africa, Central America, South America

LCL=localized cutaneous leishmaniasis. DCL=diffuse cutaneous leishmaniasis. *Subgenus is given in parentheses. Southeast Asia includes the Indian subcontinent and China

Table 1: Species* of *Leishmania* that cause human disease

Tabla 1. Principales especies de *Leishmania* causante de enfermedad en el hombre. (6)

1.6.- Leishmaniosis en la Cuenca del Mediterráneo

L. infantum es la principal especie responsable de la leishmaniosis visceral y cutánea en los países europeos de la cuenca mediterránea. Esta especie está ampliamente distribuida por esta zona, habiendo casos en países como Albania, Argelia, Bosnia, Bulgaria, Croacia, Chipre, Egipto, Eslovenia, España, Francia, Grecia, Israel, Italia, Líbano, Libia, Malta, Marruecos, Montenegro, Portugal, Rumania, Siria, Túnez y Turquía (7).

L. infantum presenta como vectores las especies *Phlebotomus ariasi* y *P. perniciosus* y como reservorio principal el perro. Se ha detectado infección en diversos animales como ratas (8-14), conejos (15), caballos (16-17), etc. Viendo su amplia distribución, no debe descartarse la posibilidad que otras especies animales puedan desempeñar este papel en la enfermedad.

1.7.- Diagnóstico de la leishmaniosis

El diagnóstico de la leishmaniosis puede ser confundido con otras patologías con signos y síntomas clínicos similares, como la malaria, el tifus o la tuberculosis, enfermedades que pueden compartir sintomatología (18-19). Pese a esto, se realizó un estudio revisando la leishmaniosis y detalló con mayor profundidad las patologías que podrían ser confundidas con las formas cutáneas o viscerales de la enfermedad (20). La sospecha clínica debe ser confirmada mediante métodos de diagnóstico de laboratorio. Estos métodos pueden basarse mediante técnicas directas: observación y/o aislamiento del parásito, técnicas inmunológicas para determinar la presencia de anticuerpos específicos: la intradermoreacción de Montenegro o prueba de la leishmanina, que es una prueba de hipersensibilidad celular tardía hacia antígenos del parásito. De las pruebas serológicas, tenemos la inmunofluorescencia, ELISA, IFI, inmunoelectrotransferencia o Western Blot e inmunohistopatología. Por último, dentro de las pruebas moleculares está la detección del ADN del parásito en tejidos mediante PCR (PCR, Nested-PCR y PCR a tiempo real) (5, 21-22).

2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

1. Hacer una revisión bibliográfica de los datos publicados referentes a animales considerados reservorios de *L. infantum*.
2. Integrar en un trabajo conocimientos correspondientes a tres ámbitos distintos de la Facultad de Farmacia cursados en los 5 años de carrera. En este caso, Parasitología como ámbito principal y Salud Pública y Biología Molecular como secundarios.
3. Aportar nuevos datos sobre posibles animales parasitados por *Leishmania* de distintas zonas de Cataluña.
4. Detectar la presencia de ADN de *Leishmania* mediante técnicas de biología molecular en diferentes animales silvestres procedentes de diferentes localidades de Cataluña
 - Determinar la presencia de ADN de *Leishmania* en hígado, bazo y en algunos casos piel (oreja) mediante técnicas de biología molecular: PCR a tiempo real.
5. Valorar a partir de los resultados obtenidos el posible papel que, los animales estudiados, puedan jugar como reservorios y en el mantenimiento de los ciclos epidemiológicos de *Leishmania*.
6. Interpretar los resultados de la búsqueda bibliográfica, y también de los resultados propios obtenidos durante el proceso práctico.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Parte teórica

La metodología se basó en realizar una búsqueda bibliográfica de información relacionada con la temática propuesta en los objetivos en bases de datos, entre otras búsquedas alternativas que surgiesen mientras se llevara a cabo.

Principalmente la búsqueda se ha efectuado mediante artículos científicos en las bases de datos:

- **Pubmed** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>): Plataforma a partir de la cual se tiene acceso a la bases de datos Medline, Cochrane (revisiones sistemáticas) y acceso a revistas a texto completo.

- **Biblioteca Nacional de Medicina** (<http://www.nlm.nih.gov/>).
- **Institutos Nacionales de la Salud** (<http://www.nih.gov/>).
- Grupo editorial **Science Direct** (<http://www.sciencedirect.com/>).

Además, en soporte de papel se han consultado los siguientes libros, disponibles en la Biblioteca de la Facultad de Farmacia:

- Manual de Parasitología (Dr. Gállego Berenguer). Ed. 2003.
- Microbiología y Parasitología (Romero Cabello, Raúl). Ed. 2007.
- Enfermedades infecciosas. Principios y práctica (Mandell, Bennet, Dolin). Ed. 2002.
- Parasitología veterinaria (Cordero del Campillo M. *et al.*). Ed. 1999.

Para todo ello, se han buscado los artículos más actuales y novedosos posibles.

3.2.- Parte práctica

3.2.1.- Material

La parte experimental y práctica se ha analizado muestras de animales silvestres procedentes de diferentes zonas de Cataluña: 11 *Vulpes vulpes*, 15 *Meles meles*, 4 *Martes foina*, 1 *Mustela vison*, 1 *Felis silvestris*, 1 *Felis catus* y 19 *Sciurus vulgaris* (Tabla 2). De cada animal se ha obtenido muestras de bazo e hígado y en algunos casos piel, que habían sido criopreservadas para su conservación. Las muestras estudiadas forman parte de un estudio más amplio sobre helmintofauna y han sido cedidas por el Dr. Alexis Ribas del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona. De estas muestras se ha llevado a cabo la extracción de ADN y posterior PCR específica para detectar la presencia de ADN de *Leishmania* spp.

CÓDIGO	ESPECIE	LOCALIDAD	MUESTRA (Hígado/Bazo/Piel)
97070501	<i>Vulpes vulpes</i>	Breda (carretera Girona Km 3,150)	H/B
2006101601	<i>Vulpes vulpes</i>	Bigues i Riells	H/B
2005092201	<i>Vulpes vulpes</i>	Dosrius	H/B
2002120601	<i>Vulpes vulpes</i>	Llinars del Vallès	H/B
2007101101	<i>Vulpes vulpes</i>	Les Franqueses del Vallès	H/B
2003012801	<i>Vulpes vulpes</i>	Les Franqueses del Vallès	H/B
990126	<i>Vulpes vulpes</i>	Santa Eulàlia de Ronçana	H/B
98061101	<i>Vulpes vulpes</i>	Fogars de Montclús	H/B
2005011804	<i>Vulpes vulpes</i>	P.N. Montnegre Corredor	H/B
2009082101	<i>Vulpes vulpes</i>	Vallgorguina	H/B

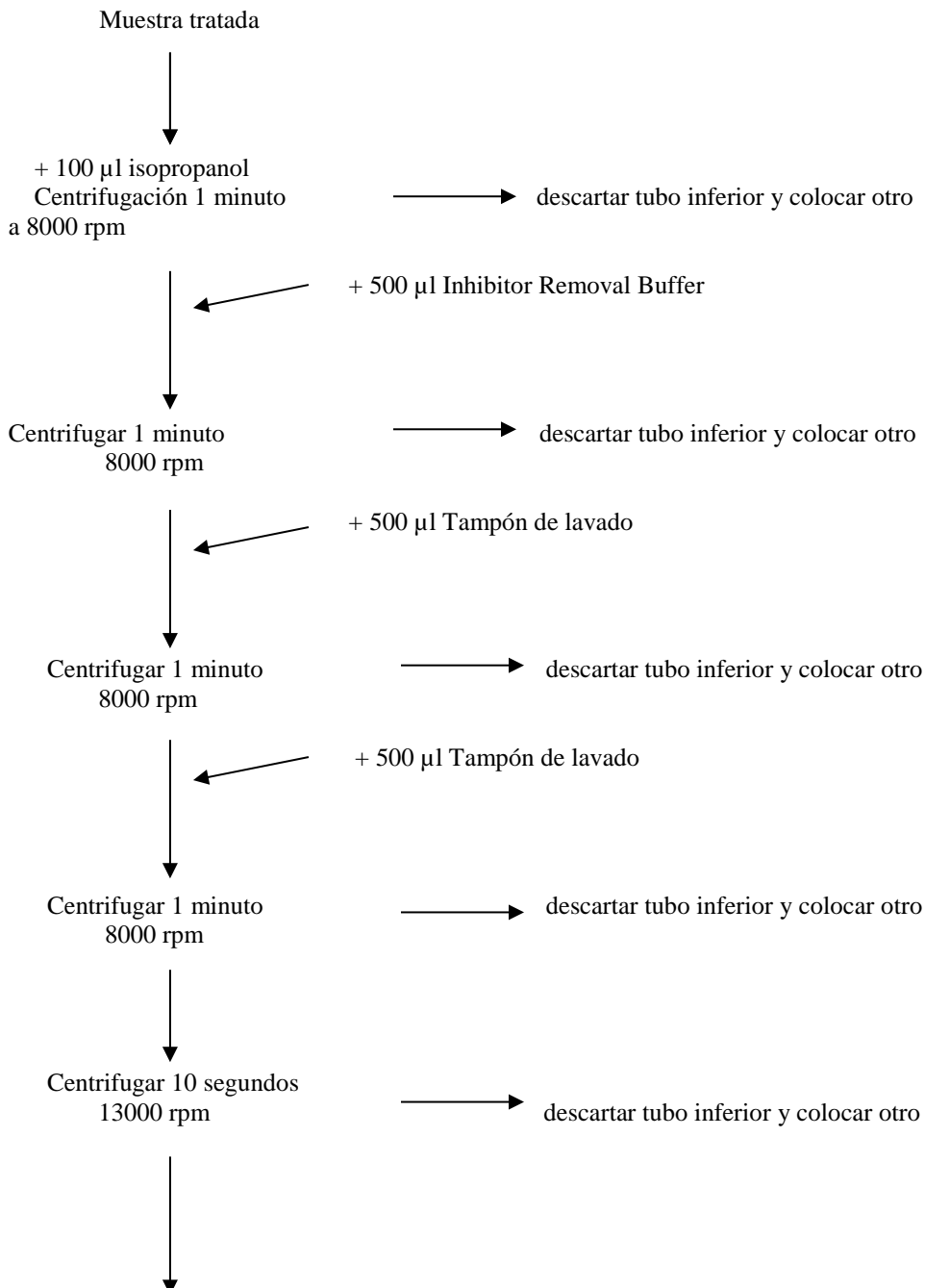
CÓDIGO	ESPECIE	LOCALIDAD	MUESTRA (Hígado/Bazo/Piel)
2010062401	<i>Vulpes vulpes</i>	L'Ametlla del Vallès	H/B
2003072901	<i>Meles meles</i>	Cardedeu	H/B
2007082301	<i>Meles meles</i>	El Brull (km 32,1)	H/B
2009040605	<i>Meles meles</i>	Cànoves y Samalús (carretera La Garriga)	H/B
97030301	<i>Meles meles</i>	Montseny	H/B
2009020301	<i>Meles meles</i>	Vilademuls, Pla de l'Estany, Girona	H/B
2007011101	<i>Meles meles</i>	Santa Pau (Les Bassedes), Girona	H/B
2000011901	<i>Meles meles</i>	Vallgorguina (carretera de Girona)	H/B
99061701	<i>Meles meles</i>	Montseny de Munt (km 20,950)	H/B
2004020901	<i>Meles meles</i>	Sant Celoni	H/B
2005011801	<i>Meles meles</i>	Parc Natural Montnegre i corredor	H/B
2001071401	<i>Meles meles</i>	Vallgorguina (Vallès Oriental), Can Pradell	H/B
2005012501	<i>Meles meles</i>	Llinars del Vallès, carr. Llinars-Sant Celoni.	H/B
2006012801	<i>Meles meles</i>	Lliça d'Amunt	H/B
2006011301	<i>Meles meles</i>	Sant Antoni de Vilamajor	H/B
2006050201	<i>Meles meles</i>	Carretera BV501 km 12, Montseny	H/B
94110601	<i>Martes foina</i>	Campins	H/B
2003000001	<i>Martes foina</i>	Sant Celoni	H/B
2010051801	<i>Martes foina</i>	Tagamanent	H/B
2005091601	<i>Martes foina</i>	Granollers	H/B
2010091001	<i>Mustela vison</i>	Maçanet de la Selva, Can Júria	H/B
2001101901	<i>Felis silvestris</i>	Pyreneés Orientales	H/B
2005022001	<i>Felis catus</i>	Cànoves (PN Montseny)	H/B
2001000001	<i>Sciurus vulgaris</i>	La Costa del Montseny	H/B
2000110501	<i>Sciurus vulgaris</i>	L'Arguilaga (Tarragona)	H/B
2005060301	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parque Natural Montseny	H/B
2004082901	<i>Sciurus vulgaris</i>	Cànoves/Samalús km 40	H/B
2004062001	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parc Natural Montseny	H/B
2005070701	<i>Sciurus vulgaris</i>	Castellar-Sant Llorenç Savall km 15,900	H/B
2010072401	<i>Sciurus vulgaris</i>	Collbató	H/B
2003080001	<i>Sciurus vulgaris</i>	Fogars de Montclús (el Vilar de Fontmartina)	H/B
2004061101	<i>Sciurus vulgaris</i>	Fogars de Montclús (el Vilar de Fontmartina)	H/B
9512501	<i>Sciurus vulgaris</i>	Mosqueroles (PN Montseny)	H/B
95011601	<i>Sciurus vulgaris</i>	Cànoves (urbanització Les Pungoles)	H/B
99031701	<i>Sciurus vulgaris</i>	Les Franqueses (Llerona, Can Gorchs)	P/ H/B
C08032901	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parc Natural de Collserola	P/ H/B
CS/2002/50 359	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parc Natural de Collserola	P/ H/B
505	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parc Natural de Collserola	P/ H/B
370	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parc Natural de Collserola	P/ H/B
CS/2002/369	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parc Natural de Collserola	P/ H/B
CS/2002/42 358	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parc Natural de Collserola	P/ H/B
C090102901	<i>Sciurus vulgaris</i>	Parc Natural de Collserola	P/ H/B

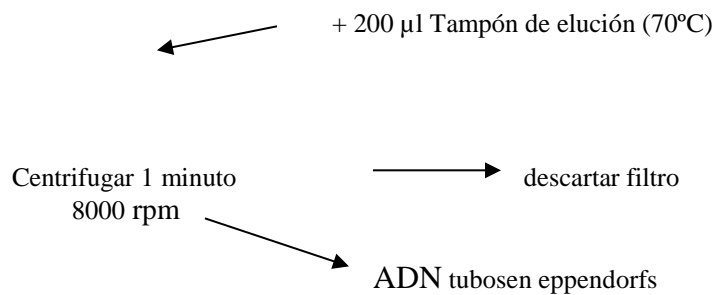
Tabla 2. Relación de animales estudiados, código asignado, especies, localización geográfica del punto de captura del animal y muestras estudiadas de cada animal (piel (P), hígado (H) y bazo (B)).
(Elaboración propia)

3.2.2.- Métodos

3.2.2.1.- Extracción de ADN

Se preparan las muestras biológicas (piel, hígado y/o bazo) triturando entre 25-50 mg de tejido que se deposita en tubos eppendorfs previamente identificados. La extracción de ADN se realiza con el kit comercial High Pure PCR Template (RocheMolecular Biochemicals). Se basa en la lisis del parásito, concentración de los ácidos nucleicos y la protección contra la degradación enzimática, así como de la eliminación de inhibidores de las reacciones posteriores. Para ello se añade 200 µl de PBS a la muestra previamente triturada, 200 µl de Binding Buffer y 40 µl de Proteinasa K y se deja en agitación (800 rpm) a 56°C “overnight”. El protocolo de extracción a seguir se muestra en el esquema siguiente:





Los tubos eppendorfs con el ADN se congelarán para las posteriores pruebas de PCR.

3.2.2.2.- PCR a tiempo real (Leim-PCR)

Es una técnica de biología molecular que permite amplificar específicamente secuencias de ADN de *Leishmania* spp del kinetoplasto y así poder detectar la presencia del parásito. La PCR actúa en ciclos, duplicándose en cada uno la totalidad del ADN. En el caso de la PCR a tiempo real, la amplificación y detección son simultáneas. Se trabaja con una sonda de hibridación TaqMan. La emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN amplificado (23).

Los cebadores utilizados son: Leim1, Leim2 con una sonda interna Leim3 que está marcada con el fluorocromo FAM.

CEBADORES Y SONDA	
Leim1	5' - CTT TTC TGG TCC TCC GGG TAG G - 3'
Leim2	5' - CCA CCC GGC CCT ATT TTA CAC CAA - 3'
Leim3	5' - FAM-TTT TCG CAG AAC GCC CCT ACC CGC-TAMRA - 3'

La Master mix utilizada ha sido de la casa Bio-Rad que emplea una iTaq polimerasa que se acompaña de un anticuerpo que impide la actividad polimerasa antes de la desnaturalización de las cadenas por la elevada temperatura, lo que hará que el anticuerpo se desnaturalice irreversiblemente y así permite una plena actividad polimerasa. Se ha seguido la pauta de la Figura 6 para preparar la reacción. Cada muestra se amplificó por duplicado, sembrando 5µl de ADN en un volumen final de reacción de 20µl en placas de 96 pocillos (Figura 7). Las muestras se amplificaron en un termociclador ABI Prism 7700 (Applied Biosystems), siendo las condiciones las siguientes: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto 55°C.

En cada reacción de amplificación se utilizaron controles con concentraciones de ADN de *L. infantum* (Figura 7) (MHOM/ES/2004/BCN-61) conocidas (10⁵ promastigotes/ml - 0,01 promastigotes/ml) para dibujar una curva patrón e interpolar en ella los valores de

los Ct de cada muestra problema y así poder calcular la concentración de ADN de cada muestra problema. Además se incluyeron controles negativos de reacción (agua).

PCR-real time: Leim1-Leim2
Número:
Fecha:

Número de muestras: 49
Total: 98
MIX total: 1960

MIX	Mix 1X	Mix 09X	[] final	Lote
Master mix				
BIO-RAD (2X)	10 µl	980 µl	1X	
Leim1-FW (10 µM)	1,5 µl	147 µl	0,75 µM	
Leim2-RV (10 µM)	1,5 µl	147 µl	0,75 µM	
Leim3-Probe (5 µM)	1 µl	98 µl	0,25 µM	
Rnase P (20X)	µl	0 µl	0,3X	
Agua	1 µl	98 µl		
ADN	5 µl	490 µl		
	20 µl	1960 µl		

Figura 6: Ejemplo de la plantilla utilizada para calcular las condiciones de la Leim-PCR según el número de muestras estudiadas. Se indican las concentraciones necesarias de cada uno de los reactivos, cebadores y sonda específica.

PCR-real time: LeiM1-LeiM2.

Número:

Fecha:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F1		F5		F9		F13		F17		F21	10 ⁵ pr om/m l
B	M1		M5		M9		M13		M17			10 ⁴ pr om/m l
C	F2		F6		F10		F14		F18		M21	10 ³ pr om/m l
D	M2		M6		M10		M14		M18			10 ² pr om/m l
E	F3		F7		F11		F15		F19			10pro m/ml
F	M3		M7		M11		M15		M19			1prom /ml
G	F4		F8		F12		F16		F20		C-	0.1pro m/ml
H	M4		M8		M12		M16		M20			0.01p rom/ ml

Figura 7: Ejemplo de plantilla de la distribución de las muestras por duplicado en la placa y de los controles positivos para la amplificación por leim-PCR en el termociclador ABI Prism 7700. (Elaboración propia)

Los resultados obtenidos se analizaron a través del programa informático Sequence Detection System 1.1 (Applied Biosystems). La lectura se basa en la determinación del ciclo Ct (Cycle Thershold) en el que la fluorescencia emitida por la reacción cruza el límite de florescencia de fondo. Se considera positivo todo Ct menor de 45.

4.- RESULTADOS DE LA PARTE TEÓRICA

L. infantum se distribuye por toda la cuenca mediterránea, Oriente Medio, Asia Central, China y América Central y del Sur (24). Sin embargo, las alteraciones climáticas resultado del calentamiento global y la actividad humana están cambiando la distribución y estacionalidad de las especies de vectores implicados en la transmisión y *L. infantum* ahora se está detectando en otras zonas como América del Norte y el norte de Europa (17, 25-28). A pesar de que el principal reservorio de *L. infantum* es el perro (*Canis familiaris*), los estudios han detectado la presencia del parásito en otros mamíferos domésticos y salvajes que pueden intervenir en el ciclo bio-epidemiológico de *L. infantum*. El conocimiento de su implicación en el ciclo puede ser importante para evaluar la distribución de la enfermedad y la posible asociación entre la infección en perros, animales silvestres y personas.

Entre los animales en los que se ha detectado la infección destacan los cánidos salvajes como chacales (*Canis aureus*) (29), zorros rojos (*Vulpes vulpes*) (11, 15, 29-32), el lobo (*Canis lupus*) (29, 33-34), gatos domésticos y salvajes (35-37), jinetas comunes (*Genetta genetta*) y comadrejas (*Mustela nivalis*) (16, 37), conejos salvajes (15), liebres (*Lepus granatensis*) (38-39), caballos (16-17, 40-41) y también roedores como *Apodemus sylvaticus*, *Mus spetrus*, *Mus musculus*, *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus* (8-14) entre otros.

4.1.- *Vulpes vulpes*

A la especie *V. vulpes* se le ha observado un acercamiento a las zonas rurales lo que puede inducir el contacto con el hombre y animales domésticos. Se ha visto esta situación en la zona de Guadalajara (España) probablemente causada por los periodos de sequía que se produjeron en la época (32). Por ello, la sospecha de la implicación de estos animales como reservorio salvaje es estudiada desde hace años.

Así en 1984 se detecta *Leishmania* en 3 de 43 zorros examinados en la región de la península de Arrábida (Setúbal) en Portugal (31). La prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue positiva con títulos mayores o iguales a 1/128 en los tres casos infectados. El perfil electroforético obtenido a partir de estos cultivos positivos mostró unas cepas idénticas a las demás aisladas en Portugal en casos de hospedadores humanos, perro y zorro, así como con las cepas en el Mediterráneo en otros lugares. Los autores calculan una tasa de prevalencia de 5,63% ya que en estudios previos habían identificado un caso, por lo que consideran un total de 4 casos en 71 animales examinados. Consideran que la tasa de prevalencia del 5,63% es probablemente suficiente para mantener una situación endémica y que la presencia de un ciclo silvestre semi-autónomo en la zona parece probable.

También hay casos en el Priorat (Cataluña) donde se detectó una positividad de 12 sobre 67 *V. vulpes* estudiados serológicamente (11). Los resultados mediante dot-ELISA de los 67 zorros analizados, de diferentes zonas de la región, demostraron la existencia de 1 individuo (1,5%, 0-5%) con un título serológico alto, que alcanzó el punto de corte establecido para los perros, y 11 zorros (16%, 7-25%), con bajos niveles de anticuerpos que indicaban contacto con el parásito.

Teniendo en cuenta el acercamiento de zorros a zonas habitadas en la zona de Guadalajara (España) se estudiaron un total de 67 zorros procedentes de tres zonas geográficas (Valle de Sorbe, Valle de Jarama y Valle de Henares) (32). Por métodos moleculares de PCR que amplifican *L. infantum* encontraron resultados positivos en un 74,6% de las muestras de bazo estudiadas (50 muestras procedentes de 50 zorros amplificadas por PCR, detectadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 5% y observadas bajo luz ultravioleta) (Tabla 3).

Species	No. of positive/total prevalence ^a	Pos./Prev.		
		Sorbe valley	Jarama valley	Henares valley
<i>Animals examined</i>	67 ^b	21	13	30
Protozoa				
<i>Leishmania infantum</i>	50/74.6	16/76.1	9/69.2	23/76.6

Tabla 3: Resultados de 67 *V. vulpes* procedentes de tres zonas geográficas de Guadalajara analizados por PCR de *L. infantum* y prevalencia detectada (32).

En un estudio sero-epidemiológico realizado en diversos focos endémicos de Cataluña (16), se investiga la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante dot-ELISA (42)

en sangre de 112 zorros, de los cuales tres de ellos resultan seropositivos (títulos altos $\geq 1/800$) y se detectan bajas tasas de anticuerpos en un número importante de zorros (36 animales con títulos 1/100-1/400). En 27 animales se estudia la presencia de amastigotes de *Leishmania* mediante examen microscópico de médula ósea o bazo, sin ningún resultado positivo.

4.2.- *Canis lupus* y *C. aureus*

En los estudios realizados en lobos en cautividad en las zonas españolas de Barcelona, Madrid, Jerez, Vergel, Bizkaia, Santillana, Cabárceno, Guadalajara, Portugal (Lisboa) y Francia (Montpellier) dieron los resultados que se indican en la Tabla 4 (34).

En las muestras de sangre de los 33 lobos se puede observar un alto porcentaje de negativos. Sin embargo, 3 muestras (9%) dan positivo en PCR a tiempo real con una carga parasitaria baja. Mediante serología tan solo dos casos presentan títulos próximos al umbral de positividad (6%), siendo uno de ellos una PCR a tiempo real positiva. Las 3 muestras positivas corresponden a zonas de Portugal, norte y centro de España, aunque cabe destacar que no se supo dónde se produjo la infección ya que habían sido intercambiadas por varias instituciones antes de descubrir el positivo.

Sampling			Wolf		<i>Leishmania</i> qPCR		ELISA	
Number	Localization	Year	Age ^a	Sex	Parasites/mL	Level	EU	Level
L1	Lisboa (previously Lleida-Spain)	2006	14	Female	5.3E-02	Low	3	Negative
L2	Lisboa	2006	7	Male	0	Negative	1	Negative
L3	Montpellier	2006	4	Female	0	Negative	4	Negative
L4	Montpellier	2006	4	Male	0	Negative	4	Negative
L5	Montpellier	2006	3	Male	0	Negative	1	Negative
L6	Montpellier	2006	3	Female	0	Negative	3	Negative
L7	Montpellier (previously Cáceres-Spain)	2006	3	Female	0	Negative	9	Borderline
L8	Madrid	2000	8	Female	1.9E-01	Low	4	Negative
L9	Lisboa	2000	8	Male	0	Negative	8	Negative
L10	Jerez	2000	6	Male	0	Negative	1	Negative
L11	Vergel	2000	4	Male	0	Negative	6	Negative
L12	Vergel	2000	4	Male	0	Negative	3	Negative
L13	Vergel	2000	4	Male	0	Negative	4	Negative
L14	Madrid	2000	2	Female	0	Negative	0	Negative
L15	Barcelona	2000	1	Female	0	Negative	1	Negative
L16	Bizkaia	2000	1	Female	0	Negative	4	Negative
L17	Bizkaia	2000	1	Female	0	Negative	5	Negative
L18	Santillana	2000	7	Male	0	Negative	4	Negative
L19	Santillana	2000	7	Female	0	Negative	2	Negative
L20	Barcelona (previously Jerez)	2000	4	Female	1.4E-01	Low	10	Borderline
L21	Cabárceno	2006	1	Male	0	Negative	3	Negative
L22	Guadalajara	2006	2	Female	0	Negative	1	Negative
L23	Barcelona	2000	4	Female	0	Negative	7	Negative
L24	Cabárceno	2006	1	Female	0	Negative	5	Negative
L25 ^b	Madrid	2006	5	Female	0	Negative	8	Negative
L26 ^b	Madrid	2006	5	Male	0	Negative	1	Negative
L27	Madrid	2000	7	Male	0	Negative	1	Negative
L28	Madrid	2000	2	Male	0	Negative	4	Negative
L29	Bizkaia	2000	6	Female	0	Negative	1	Negative
L30 ^b	Santillana	2000	3	Female	0	Negative	4	Negative
L31 ^b	Santillana	2000	3	Male	0	Negative	0	Negative
L32 ^b	Madrid	2006	5	Female	0	Negative	2	Negative
L33	Cabárceno	2006	3	Female	0	Negative	0	Negative

Tabla 4: Datos sobre estudios realizados en 33 lobos en cautividad de distintas zonas de España, Portugal y Francia. Detección y cuantificación de ADN de *Leishmania* mediante PCR a tiempo real y resultados serológicos obtenidos (34).

En un estudio epidemiológico para examinar la sero-prevalencia de la leishmaniosis entre los cánidos domésticos y salvajes en los focos endémicos de Irán (33) se estudian 30 sueros de animales salvajes: chacales (*C. aureus*, n = 10), zorro (*V. vulpes*, n = 10) y lobos (*C. lupus*, n = 10). Los anticuerpos anti-*Leishmania* son detectados por la prueba de aglutinación directa (DAT) y ELISA en 1 chacal, 1 zorro y 1 lobo y la infección confirmada por examen directo y cultivo, confirmándose la especie causal como *L. infantum* mediante RAPD-PCR.

4.3.- *Martes spp*, *Genetta spp* y *Mustela spp*

Respecto a estas especies, se realiza un estudio de la prevalencia entre 169 animales procedentes de las Islas Baleares, 48 de ellos son perros de una perrera local, 86 gatos salvajes capturados en la naturaleza, 23 *M. martes*, 10 *G. genetta* y 2 *M. nivalis* (37). Las muestras se corresponden a suero, sangre y/o muestras de bazo y los análisis se efectúan mediante Western Blot y PCR a tiempo real. La evidencia de contacto por *L. infantum* se detecta en el 56% de los perros, el 26% de los gatos, 39% de *M. martes* y 10% *G. genetta*, por el contrario no se detecta en las comadreja (Tabla 5). Este estudio tiene en cuenta la época de recolección de los animales y así los gatos fueron encontrados en las tres temporadas estudiadas: 28% (5/18) en el invierno, el 31% (10/32) en el verano y el 17% (4/23) en el otoño. Aun así, las diferencias no son significativas (Fisher P> 0,05). *M. martes* infectadas también se encontraron en todas las estaciones, con una prevalencia del 55% (5/9) en la temporada de verano (de abril a septiembre) y del 27% (3/11) entre octubre y marzo. Estas diferencias tampoco son estadísticamente significativas (Fisher P= 0,36).

	n	Seropositive (Western Blot)	Infected (PCR)	Evidence of contact ^a
Kennel dog	48	37.5% (24.8—52.1)	43.8% (30.0—58.4)	56.3% (41.6—70.0)
Feral cat	86	15.7% (8.9—25.2) ^b	26.0% (17.0—37.6) ^c	25.6% (17.3—36.0)
Pine marten	23	n.p.	39.1% (21.2—61.1)	39.1% (21.2—61.1)
Common genet	10	n.p.	10.0% (0.5—44.6)	10.0% (0.5—44.6)
Weasel	2	n.p.	0%	0%

^aPositive either for WB or PCR.

^bn = 83; ^c n = 73.

n.p., not performed.

Tabla 5: Resultados serológicos mediante Western Blot y de detección de ADN de *Leishmania* mediante PCR a tiempo real de distintas especies de animales procedentes de las Islas Baleares. (37)

Por otro lado, en un estudio ya mencionado (16) realizado en distintas comarcas de Cataluña se estudian 15 martas, 12 tejones, 10 jinetas, 6 hurones y 1 gato salvaje. Mediante dot-ELISA y ELISA sobre muestras de sangre recogidas en papel de filtro se

detectan bajas tasas de anticuerpos en 1/15 martas, 3/12 tejones y 2/10 jinetas. Al no disponer de muestras de médula o bazo de dichos animales no pudo confirmarse parasitológicamente la infección por *Leishmania*. En el mismo trabajo de revisión se presentan los datos sobre el estudio serológico de 236 ovejas y 122 cabras en los que también pudieron detectarse bajas tasas de anticuerpos (28/236 ovejas, 23/122 cabras).

4.4.- *Lepus granatensis*

En el último trimestre de 2010 se detecta un aumento en el número de casos de leishmaniosis notificados con respecto a años anteriores en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid (43) que se ha relacionado con la presencia de liebres infectadas por *L. infantum*. A raíz de este brote, en 2012 se realiza un estudio en el cual se emplean muestras de sangre de la oreja de la liebres (*L. granatensis*) expuestas a *P. perniciosus* (38). Con los resultados se demuestra que cuatro de cada siete liebres (57,14%) fueron capaces de infectar una media de 4,7% *P. perniciosus* (0-10,6%). Los resultados de xenodiagnóstico se muestran en la Tabla 6.

Date of xenodiagnosis	Hare code	No. fed sand flies	No. of fed sand flies dissected	Total no. of positive sand flies (%)
01/12/11	L18	85	63	5 (7.9%)
01/12/11	L19	55	25	0
11/01/12	L34	75	47	5 (10.6%)
11/01/12	L35	58	38	2 (5.3%)
11/01/12	L38	82	45	0
11/01/12	L39	63	42	0
11/01/12	L40	80	33	3 (9.1%)

Tabla 6: Resultados de xenodiagnósticos de siete liebres positivas después de la exposición a 100 *P. perniciosus* (38)

En un segundo estudio para una mejor comprensión de este foco de leishmaniosis, se realiza una detección de ADN de *Leishmania* en flebótomos mediante técnicas de PCR (39). La identificación taxonómica de flebótomos capturados (n = 174) como *P. perniciosus* (n = 171) y *Sergentomyia minuta* (n = 3), junto con el análisis de la alimentación de sangre en diez moscas de la arena que muestra una alta preferencia por las liebres (n = 6), seguidos por los seres humanos (n = 3), y los gatos (n = 1) confirman una fuerte asociación entre *P. perniciosus*, liebres y seres humanos en el foco. Por otra parte, 79 de 135 (58,5%) *P. perniciosus* fueron positivos a *L. infantum* por PCR. Estos datos apoyan el aumento de casos de leishmaniosis humana en la zona y la existencia de una alternativa al ciclo biológico ya conocido.

4.5.- Gatos domésticos y salvajes

Se ha demostrado que estos animales que cohabitan con los seres humanos pueden ser infectados, aunque sólo unos pocos casos desarrollan la enfermedad (44).

Primeramente, se estudia la seroepidemiológico, en el Priorat catalán, sobre 117 gatos y un gato silvestre el hallazgo de 2 animales con serologías bajas, con títulos entre 10-24 U detectados por ELISA (16).

Por otro lado, se describe un caso de leishmaniosis en gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) en Italia en un estudio sobre la prevalencia de la leishmaniosis felina asintomática realizado en el área en la que se identificó un gato infectado. Este, reveló una baja seroprevalencia de infección, tan sólo 1 (0,9%) de los 110 gatos examinados por prueba de IFI fue positivo (45).

En otra revisión sobre 445 gatos del noreste de la Península Ibérica y de las Islas Baleares se detecta una seroprevalencia por ELISA de 6,29%. Los autores indican su posible papel como reservorio secundario peridoméstico, y no tan solo como hospedador accidental (36).

Otros autores indican que se han reportado en la literatura científica más de 40 casos (35). En su trabajo estudian 183 gatos del sur de España por IFAT, PCR, examen directo y/ cultivo. La seropositividad es del 60,0% al considerar títulos de anticuerpos de 1/10 y de 28,3% con títulos $\geq 1/40$. El 25,7% de los gatos estudiados presentan parasitemia detectada mediante PCR que en algunos casos persiste en el tiempo. En algunos gatos se observa amastigotes de *Leishmania* por tinción de *Giemsa*. Combinando los datos, el 70,6% de la población felina estudiada podría considerarse como infectada.

En la zona de Madrid se realiza un estudio de prevalencia de leishmaniosis en gatos (46). En este caso, se recolectan 233 gatos y se les realiza pruebas de IFI y PCR. Los resultados demuestran una seroprevalencia de 1,29% (3/233) mediante IFI. Otros 7 gatos también son seroreactivos a *L. infantum*. Teniendo en cuenta todas las muestras seroreactivas, el porcentaje de animales positivos es del 4,29%. Sólo uno de los gatos (0,43%) incluidos en el estudio es PCR-positivo.

Por último, en el estudio ya mencionado anteriormente (37) de las Islas Baleares (Tabla 5), se introduce también 86 muestras de gatos salvajes y observó que el 26% da evidencia de contacto con *L. infantum* por PCR y el 15,7% por Western Blot.

4.6.- Conejos salvajes

Otro posible hospedador animal salvaje estudiado en el sudeste de España (Valencia, Alicante y Murcia) es el conejo salvaje. Se realiza en un estudio epidemiológico sobre conejos salvajes, humanos y perros domésticos (15). En este, se presentan 162 conejos salvajes, 212 perros y 657 muestras de sangre humana (Tabla 7). De los conejos y perros se recogen muestras de bazo, ganglios linfáticos y la piel de la nariz y además hígado, riñón, corazón y páncreas únicamente de los conejos. Las muestras se analizan mediante técnicas de PCR a tiempo real que amplifican ADN del kinetoplasto de *Leishmania* spp y se estudia la presencia de anticuerpos específicos anti-*Leishmania* por técnicas de ELISA.

Diagnostic assay	Sample type	Mammalian species					
		Rabbit		Human		Dog	
		No. tested	% positive	No. tested	% positive	No. tested	% positive
PCR	Blood	0	–	392	2	193	10
	Spleen	129	0,8	0	–	35	60
	Lymph node	49	0	0	–	38	53
	Skin	39	0	0	–	26	42
	Bone marrow	106	0	0	–	0	–
	Other tissues ^a	56	0	0	–	0	–
	Any tissue	162	0,6	0	–	43	67
ELISA	Plasma	36	0 ^b	657	2 ^b	208	7 ^b

Tabla 7: Resultados de PCR de conejos salvajes, perros y humanos procedentes de el sudeste de España (15)

Se detecta un único conejo positivo mediante PCR, tan sólo se observa ADN de *Leishmania* en una muestra de bazo de un ejemplar con unos valores muy bajos de parasitación (Ct 40). El porcentaje de positividad del 0,6% (1/162) es muy bajo y sugiere, según los autores, que esta especie presenta un riesgo muy bajo de mantener crónicamente la enfermedad. Las 377 muestras de tejidos restantes analizadas son negativas por PCR. Uno de 36 (3%) conejos analizados por ELISA tiene un resultado concluyente (ROD = 0,87) y los conejos restantes resultan negativos. En este estudio se analizan además muestras de personas asintomáticas. El porcentaje de muestras de sangre humana positivas por PCR es del 2% (8/392) con Ct que oscilan entre 33 y 38. Por otra parte, los porcentajes de muestras positivas en ELISA de humanos son del 2% (13/657). Entre los perros, los porcentajes de los resultados de ELISA positivos son del 7% (14/208) y el porcentaje de perros PCR-positivos varían dependiendo del tipo de muestra utilizada, 10% (20/193) en la sangre y el 67% (29/43) en los tejidos, es decir, 60% (21/35) en el bazo, el 53% (20/38) en los ganglios linfáticos y el 42% (11/26) en la piel.

4.7.- Roedores

Rattus rattus, *Rattus norvegicus*, *Mus spretus*, *Mus musculus* y *Apodemus sylvaticus* son las especies de roedores que presentan estudios de un posible papel en el ciclo biológico de *L. infantum*.

Tanto en España como en Cataluña no hay muchos estudios en roedores. La rata negra (*R. rattus*) se ha encontrado parasitada por *L. infantum* en España (prevalencia 1%) e Italia (prevalencia 2,1%) (9-10). Dos estudios realizan una revisión de la infección por *L. infantum* en 106 roedores recogidos en la zona del Priorat catalán (17 *Rattus spp.*, 69 *M. spretus*, 9 *M. musculus* y 28 *A. sylvaticus*) (11, 16). Las muestras corresponden a sangre en papel de filtro. Se realiza una técnica ELISA y dan positivos 8 del total de roedores. En estos estudios se detecta una seroreactividad global de 7,5% (8/106) y por especies un 10,1% (IC 95:4,7%-19,8%) en el caso de *M. spretus* y 3,6% (IC 95 0,1%-19,25%) en el caso de *A. sylvaticus* que resultan seroreactivos al antígeno de *Leishmania* con títulos serológicos por debajo del nivel de positividad ($\geq 1/400$).

La rata ha estado involucrada en el Sur de Italia (Calabria y Sicilia) como un posible reservorio de *Leishmania* ya que se ha detectado en *R. rattus* una seroprevalencia de 57,5% y ADN de *Leishmania* por PCR en un 45%. Respecto a *R. norvegicus* la seroprevalencia detectada es de 33,3% (12). Los estudios serológicos se centran en las poblaciones de *R. norvegicus* (Villa Niscemi, Palermo) y de *R. rattus* (Fiumefreddo Bruzio, Cosenza). Se realizan capturas ocasionales de *M. musculus* en Villa Niscemi y áreas Fiumefreddo Bruzio, y de *R. rattus* en Villa Niscemi. Los análisis serológicos se efectúan en un total de 24 individuos de *R. rattus* y 4 de *M. musculus* de Fiumefreddo Bruzio, así como 9 de *R. norvegicus*, 4 de *R. rattus* y 13 de *M. musculus* de la Villa Niscemi. Los resultados concluyen positivos en la población de *R. rattus* de Fiumefreddo Bruzio (n=22) con un porcentaje del 57,5%. La prevalencia sérica es inferior, por el contrario, en *R. norvegicus* en Villa Niscemi (Palermo): 33,3% (n=9). En esta última, también queda registrado un caso de positividad serológica en un solo individuo de *M. musculus*. Los resultados de la PCR, relativos a los análisis llevados a cabo en muestras de bazo a partir de muestras de *R. rattus* atrapados en Fiumefreddo Bruzio muestran una prevalencia calculada del 45% (n=20) (Tabla 8).

Trapping locality	Fiunefreddo Bruzio(Cosenza) Rural area,5 m a.s.l. situated on the Calabria coast; Grid n 50 Havahart traps, at a distance of 15 m from each other, 5x10 lines;	Villa Niscemi (Palermo) Town garden 5 m a.s.l.situated in the city of Palermo; Grid: n. 49 Havart traps at a distance of 10 m from each other, 14 lines;
Population density of the species considered	Species: <i>Rattus rattus</i> , valued density =22.2 rats per ha (CMR method);	Species: <i>Rattus norvegicus</i> , valued density = 12.75 rats per ha (removal method);
Serological results	57.5% positive <i>R.rattus</i> (n=22)	Leshmania: 33.3% positive for <i>R.norvegicus</i> (n=9), 1 positive for <i>Mus musculus</i> (N=13);
Results of PCR	45% positive for <i>R.rattus</i> (n=20);	

Tabla 8: Resultados sero-epidemiológicos y de detección de la presencia de ADN de *Leishmania* en roedores capturados en zonas endémicas de leishmaniosis en Calabria y Sicilia. (12).

En la Península Ibérica, concretamente en Portugal (Sesimbra y Sintra) se estudian 30 roedores (27 *M. musculus* y *R. norvegicus* 3) de los cuales se analizan los hígados y bazos mediante análisis parasitológico y PCR a tiempo real (14). Los resultados del análisis dan presencia de amastigotes de *Leishmania* en 8 individuos de *M. musculus* (n=27). 2 animales son positivos tanto en el frotis de las secciones histológicas de hígado y en el bazo, 2 animales positivos en ambos frotis del hígado y el bazo, 3 animales positivos en la sección histológica del bazo y 1 animal positivo en el frotis de hígado. En cuanto a *R. norvegicus* (n=3), un animal es positivo en el frotis del hígado y del bazo simultáneamente. Cabe destacar que todas las muestras positivas muestran no más de tres amastigotes por campo microscópico. En cuanto al análisis molecular se detectan 9 muestras positivas de piel del oído de *M. musculus*. La carga parasitaria varía entre la detección de los valores residuales a 393 copias específicas, indicativos de baja carga parasitaria (Tabla 9).

Rodent species	Rodent n°	qPCR analysis (parasitic load)			Parasitological analysis			
		Ear lobe	Liver	Spleen	Liver smear	Liver H.S.	Spleen smear	Spleen H.S.
<i>Rattus norvegicus</i>	1	N	N	N	N	N	N	N
	2	N	N	N	N	N	N	N
	3	N	N	N	P	N	P	N
<i>Mus musculus</i>	4	N	N	N	P	N	P	N
	5	P (72)	N	N	N	N	N	P
	6	P (50)	N	N	N	N	N	N
	7	N	N	N	N	N	N	N
	8	N	N	N	P	N	N	N
	9	N	N	N	N	N	N	N
	10	P (100)	N	N	N	N	N	P
	11	N	N	N	N	N	N	N
	12	N	N	N	N	N	N	N
	13	P (393)	N	N	N	N	N	N
	14	N	N	N	N	N	N	N
	15	N	N	N	N	N	N	N
	16	N	N	N	N	N	N	N
	17	N	N	N	P	N	N	P
	18	N	N	N	N	N	N	N
	19	P (50)	N	N	P	N	P	N
	20	N	N	N	N	N	N	N
21	N	N	N	N	N	N	N	
22	N	N	N	N	N	N	N	
23	N	N	N	N	N	N	N	
24	P (resid)	N	N	N	N	N	N	
25	N	N	N	N	N	N	N	
26	N	N	N	N	N	N	N	
27	P (resid)	N	N	N	N	N	P	
28	N	N	N	N	N	N	N	
29	P (resid)	N	N	N	N	N	N	
30	P (resid)	N	N	P	N	N	P	

Legend: P: Positive result; N: Negative result; H.S.: Histological section.; resid: residual.

Tabla 9: Resultados de 30 de roedores capturados en zonas endémicas de leishmaniosis en Portugal y analizados mediante técnicas de PCR a tiempo real y análisis parasitológico (14)

Por otro lado, en estudios realizados en Grecia sobre *R. norvegicus* se ha detectado ADN de *L. infantum* en muestras de bazo mediante técnicas de PCR. De las 16 muestras examinadas, sólo uno resulta positivo para *L. infantum* con escasa cantidad de ADN presente. Los resultados de este estudio preliminar indican que *R. norvegicus* es poco probable que sea un hospedador potencial en Grecia (13). En la isla de Chipre se indican seroprevalencias de 7,3% (36/494) estudiadas también en *R. norvegicus* (47).

Respecto a roedores e insectívoros capturados en diferentes puntos estudiados en la zona del Vallés Oriental, provincia de Barcelona (datos no publicados), en un Trabajo Dirigido realizado por la alumna Isabel Ragull en el Departamento de Parasitología sobre 62 roedores y 1 insectívoro (42 *A. sylvaticus*, 9 *Myodes glareolus*, 7 *Crocidura russula*, 13 *M. spretus* y 1 *R. rattus*) destaca la seroreactividad detectada en 3 *M. spretus* (dos de la Roca del Vallés y un de Cànoves) y en 2 *A. sylvaticus* (uno de Bigues i Riells y el otro de la Roca del Vallés). La seroprevalencia global encontrada ha sido del 7,5% (5/66). En el caso de *M. spretus* es de un 23,1% (3/13) (IC 95%: 7,5%-50%) y en el de *A. sylvaticus* de un 4,7% (2/42) (IC 95%: 0,4%-16%). Destaca el hecho de que en uno de los tres *M. spretus* seropositivos se detectan bajas tasas de ADN de *Leishmania* en sangre. Al comparar estos datos con los de Portús *et al.*, (2002) (16) sobre estos

animales en la zona del Priorat se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

5.- RESULTADOS DE LA PARTE PRÁCTICA

Los resultados globales del estudio: determinación de ADN de *L. infantum* en muestras de bazo, hígado y algunas de oreja por PCR a tiempo real están recogidas en la Tabla 10.

Especie	PCR global (positivo/nº de muestras)	PCR según muestra estudiada (positivo/nº de muestras)		
		Hígado	Bazo	Piel
<i>V. vulpes</i>	0/11	0/11	0/11	0/0
<i>M. meles</i>	0/15	0/15	0/15	0/0
<i>M. foina</i>	2/4	2/4	2/4	0/0
<i>M. vison</i>	1/1	1/1	1/1	0/0
<i>F. catus</i>	1/1	1/1	1/1	0/0
<i>F. silvestris</i>	0/1	0/1	0/1	0/0
<i>S. vulgaris</i>	3/19	3/19	3/19	0/8

Tabla 10: Resultados de las PCR de las diferentes especies estudiadas. Resultados globales y por muestras biológicas. (Elaboración propia).

Al realizar las PCR a tiempo real (Leim-PCR) se puede observar la detección de un total de 7 animales positivos de 52 (13,5%, IC 95% 5,59-25,79%). En ningún ejemplar estudiado de *V. vulpes* y de *M. meles* se detecta ADN de *Leishmania*. Las muestras son positivas para dos ejemplares de *M. foina* de los 4 estudiados tanto en hígado como en bazo, que corresponden a animales recogidos en Tagament y en Granollers. En cuanto a *M. vison* el único individuo (Maçanet de la Selva) estudiado resulta ser positivo tanto en la muestra de bazo como de hígado. Por otro lado, el único ejemplar estudiado de *F. catus* (Parque Natural del Montseny) da positivo pero únicamente en la muestra de bazo. Por último, en los 3 positivos de los 19 animales estudiados de *S. vulgaris* se detecta ADN de *Leishmania* tanto en hígado como en el bazo (Figura 8). En todos los casos, los valores de PCR a tiempo real presentaron Cts muy altos del orden de 35-39 que indican unas tasas de parásitos muy bajas. En ninguna de las 8 muestras de piel estudiadas, todas ellas de *Sciurus vulgaris*, pudo detectarse ADN de *Leishmania*.

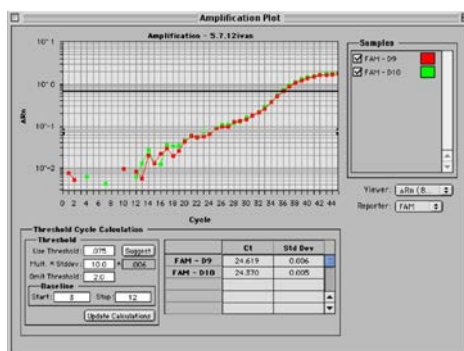


Figura 8: Resultado positivo de la amplificación mediante Leim-PCR de la muestra de hígado del individuo CS/2002/42358 de *S. vulgaris*.

Para cuantificar la cantidad de ADN de *Leishmania* detectada se introdujeron en las placas de amplificación una batería de parásitos a concentraciones conocidas. En la Tabla 11 se indican las diluciones de parásitos amplificadas en promastigotes/ml y los resultados en Ct de la amplificación obtenidos. La metodología permite detectar tasas muy bajas hasta 0,01 promastigote/ml.

CONTROL +	Ct
10 ⁴ prom/ml	15,3
10 ³ prom/ml	18,5
10 ² prom/ml	22,7
10 prom/ml	25,9
1 prom/ml	31,4
0,1 prom/ml	35,4
0,01 prom/ml	38,7

Tabla 11: Batería de controles positivos de *L. infantum* expresados en promastigotes/ml y su equivalencia en Ct después de la amplificación por Leim-PCR. (Elaboración propia)

6.- DISCUSIÓN

Según la OMS, 350 millones de personas están en riesgo de contraer dicha enfermedad, así que la leishmaniosis es un tema a tratar y someter a estudio. Es importante saber las zonas endémicas, así como los posibles vectores y hospedadores para evitar la infección.

Aunque el principal reservorio de *L. infantum* es el perro, los resultados de los animales revisados a lo largo de este trabajo indican la posibilidad de estar parasitados. Se sospecha que el perro no es el único reservorio debido al hecho que algunos zimodemas sólo sean conocidos a partir de cepas aisladas del vector o del hombre como puede ser un ejemplo el Zimodema MON-29, que se detectó en el Priorat y se aisló muchas veces de los vectores, pero nunca se ha podido aislar de vertebrados en ese foco endémico

(11). En algunos de estos animales era desconocido el hecho de que pudiesen estar infectados por este parásito hasta hace poco y algunos todavía no se sabe cuál es el papel que puede mantener en el ciclo del protozoo.

Los resultados recopilados a lo largo de este trabajo, indican que es más que probable que *L. infantum* esté presente en la vida de otros hospedadores, por ejemplo se detecta un 74,6% de positividad de un total de 67 *V. vulpes* (32), por el contrario, en otros estudios sobre esta especie los positivos son más bajos 12 de 67 (11), 3 de 112 (16) y 3 de 43 (31) aunque en este último consideran que la tasa de prevalencia del 5,63% de *V. vulpes* es probablemente suficiente para mantener una situación endémica y que la presencia de un ciclo silvestre semi-autónomo en la zona parece probable.

Unos estudios que hay que tener muy en cuenta son los efectuados a consecuencia del brote de leishmaniosis del 2010 en la Comunidad de Madrid donde descubre que el 57,14% de *Lepus granatensis* presentan el parásito (38-39). Muy importante también, es el más que posible papel de los gatos ya que se aporta una seroprevalencia del 6,29% en el noreste de la Península Ibérica y de las Islas Baleares, a lo que los autores indican su posible papel como reservorio secundario peridoméstico, y no tan solo como hospedador accidental (36). Reforzando el papel del gato, se concluye que el 70,6% de la población felina estudiada podría considerarse como infectada (35) y más tarde, también en las Islas Baleares, se observa un 26% de evidencia de contacto con *L. infantum* por PCR y el 15,7% por Western Blot (37). Se ha encontrado un foco importante de roedores en el sur de Italia con una seroprevalencia de 57,5% en *R. rattus* y ADN de *Leishmania* por PCR en un 45% y seroprevalencia de 33,3% en *R. norvegicus* (12) cosa que hace pensar fuertemente en que estas especies pueden estar involucrados en el ciclo del parásito. En la zona de Cataluña, los resultados dados (16) y los no publicados de Isabel Ragull no encontramos diferencias significativas.

Para que un animal sea considerado como reservorio en un foco determinado existen varios requisitos necesarios, no tan solo debe detectarse el parásito sino que es necesario otros parámetros ligados al área de distribución de la enfermedad, al tipo de parásito que se aísla y a la evolución que debe ser crónica en el animal, y también referidos al vector y a sus hábitos de alimentación. Los animales pueden además actuar como reservorios principales, como es el perro en nuestros focos endémicos, o secundarios o incluso accidentales (48).

Los valores de Ct de PCR a tiempo real proporcionan una idea de la carga parasitaria en las muestras estudiadas. Gran parte de las muestras de los diferentes artículos reflejan unos valores de Ct altos, lo que es indicativo de carga parasitaria baja. Los estudios sugieren la posibilidad que las especies presentes en zonas endémicas puedan infectarse de forma natural.

En referencia a la parte práctica de este trabajo, los animales que resultan positivos son especies no estudiadas anteriormente en la zona: 1 positivo en *F. catus*, 2 en *M. foinea*, 2 en *S. vulgaris* y 1 en *M. vison*. Como se ha comentado, los valores de Ct de PCR a tiempo real proporcionan una idea de la carga parasitaria en las muestras estudiadas, en estos casos son indicativos de una carga baja y un porcentaje de positivos relativamente pequeños. Cabe destacar que de estos resultados no se puede hacer un juicio definitivo ya que el número de muestras recopiladas es reducido, además de que los Ct resultantes son muy altos pero pueden ser indicativos de infección y/o contacto con el parásito que podrían estar presentes durante mucho tiempo. Por ello, su presencia puede ser resultado de infección pero no implica el papel como reservorio. Por otro lado, los resultados negativos por PCR no descartan la posible presencia del parásito en otras localizaciones.

En definitiva, es muy importante tener presente que estos estudios no dan un resultado claro y definitivo de la posibilidad de que los animales muestreados se incluyan en los hospedadores de *L. infantum* ya que las conclusiones son, en muchos casos, en base a una población muy reducida, por ello deben realizarse más trabajos con más muestras para demostrarlo. Esto sería ventajoso desde un punto de vista veterinario y perspectivas de la salud pública y también puede mejorar nuestra comprensión de un posible ciclo silvestre del parásito. Además la vigilancia de la infección en los hospedadores silvestres también sería beneficioso para estimar la incidencia de infección y aportar pruebas de una posible expansión de *L. infantum* en su distribución natural.

7.- CONCLUSIÓN

- La infección por *Leishmania* supone un problema de salud pública ampliamente distribuido afectando a millones de personas. En referencia a este trabajo, en la Cuenca del Mediterráneo se encuentra un importante foco de *L. infantum* causante de leishmaniosis cutánea y visceral.
- Los resultados teóricos, indican la evidencia de infección por *Leishmania*, detectada mediante examen directo, cultivo, detección de ADN y/o detección de

anticuerpos específicos anti-*Leishmania*, de diversas especies silvestres y domésticas como el lobo, el chacal, el zorro, roedores entre ellos las ratas, el gato doméstico y silvestre, los conejos y las liebres.

- Se detecta la necesidad de potenciar los estudios epidemiológicos sobre la enfermedad y los posibles hospedadores implicados, al lado del reservorio canino considerado el reservorio principal, para conocer mejor el papel que estos animales pueden jugar en el mantenimiento del ciclo epidemiológico, en la distribución geográfica de la enfermedad y para mejorar el control de la infección.
- Los estudios de PCR a tiempo real realizados en la parte experimental han permitido detectar ADN de *Leishmania* spp en 7 de los 52 animales estudiados (13,5%, IC 95% 5,59-25,79%). Las muestras positivas fueron de hígado y bazo de 2 *M. foinea*, 1 *M. vison*, 1 *F. catus* (positividad sólo detectada en la muestra de bazo) y 3 de *S. vulgaris*, todas ellas con cargas parasitarias muy bajas. En ninguna de las 8 muestras de piel estudiadas, todas ellas de *S. vulgaris*, pudo detectarse ADN de *Leishmania*.
- Los resultados obtenidos, en la parte práctica, en este estudio inicial de *Leishmania* en diferentes localizaciones de Cataluña, zona endémica de leishmaniosis cutánea y visceral señalan la necesidad de proseguir con los estudios epidemiológicos enfocados a detectar la presencia del parásito en un número mayor de individuos para conocer su posible papel como reservorios. Además indican la necesidad de estudiar otras muestras biológicas como pueden ser sangre y la piel.
- Es necesario seguir con la investigación en el campo de la biología molecular para mejorar las técnicas o potenciar otras nuevas y así poder detectar con un mayor índice de acierto las infecciones de los hospedadores. Su detección podría permitir además la identificación posterior mediante genotipado a nivel intraespecífico para mejorar el conocimiento sobre qué papel pueden ejercer estos animales en los ciclos bioepidemiológicos de *Leishmania* en las zonas endémicas.
- Abrir nuevas vías de investigación y ensalzar las relaciones entre los países de las zonas endémicas para poder llevar una línea de investigación mejor y tener mejor controlada la infección.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- (1) World Health Organization (W.H.O.) 2004. Report on Leishmaniasis. Report of the Scientific working Group on Leishmaniasis, Geneva.
- (2) Levine N. D., Corliss J. O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, 27, 37-58.
- (3) Gállego, J. 2003. *Manual de Parasitología*. Ed. Universitarias de Barcelona. 173-9.
- (4) OMS. Consejo ejecutivo EB118/4. *118ª reunión*. (11 de mayo de 2006).
- (5) Romero Cabello, R. 2007. *Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana.
- (6) Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 7(9):581-96.
- (7) World Health Organization (W.H.O.). 2010. Control of leishmaniasis. Report of a meeting of the W.H.O. expert committee on the control of leishmaniasis, Geneva.
- (8) Bettini S, Gradoni L, Pozio E., 1978. Isolation of *Leishmania* strains from *Rattus rattus* in Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.72(4):441-2.
- (9) Bettini S, Pozio E, Gradoni L. 1980. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). II. *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 74: 77-83.
- (10) Morillas-Márquez, F.; Benavides-Delgado, I.; González-Castro, J.; Reyes-Magaña, A.; Valero-López. 1985. Occurrence of *Leishmania* sp in *Rattus rattus* in the province of Granada. *Ann Parasitol Hum Comp*, 60, 768-70.
- (11) Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol*. 83, 87-97.
- (12) Di Bella C, F. Vitale, G. Russo, A. Greco, C. Milazzo, G. Aloise, M. Cagnin 2003. Are rodents a potential reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? – *J Mount Ecology*, 7 (Supl.): 125-9.
- (13) Papadogiannakis, E., Spanakos, G., Kontos, V., Menounos, P.G., Tegos, N., Vakalis, N., 2010. Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoo Pub Health* 57, 23-5.

- (14) Helhazar M., Leitão J., Duarte A., Tavares L., Pereira da Fonseca I. 2013. Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus rattus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra, Portugal. *Parasites and Vectors*. 6:88.
- (15) Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., delRío, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, A., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarria, M.A., Sanchis-Monsonís, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011. Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet Parasitol*. 181, 12–6.
- (16) Portús M, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, Fisa R, Castillejo S. 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in the Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev Ibér Parasitol*, 62:72-6.
- (17) Koehler K., Stechele M., Hetzel U., Domingo M., Schönian G., Zahner H., Burkhardt E. 2002. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmaniainfantum*. *Vet Parasitol*, 109:9-17.
- (18) Maia C., Campino L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. 158; 274-87.
- (19) Sundar S., Rai M. 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagnostic Laborat Immunol*. 9 (5): 951-8.
- Willingham AL, Ockens NW, Kapel CM, Monrad J. 1996. A helminthological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the metropolitan area of Copenhagen. *J Helminthol*. 70(3):259-63.
- (20) Herwaldt B.L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, 354: 1191-9.
- (21) Fisa R, Riera C, Ribera E, Gállego M, Portús M. 2002- A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 96 Suppl 1:S191-4.
- (22) Martín-Ezquerria G, Fisa R, Riera C, Rocamora V, Fernández-Casado A, Barranco C, Serra T, Baró T, Pujol RM. 2009. Role of *Leishmania* spp. infestation in nondiagnostic cutaneous granulomatous lesions: report of a series of patients from a Western Mediterranean area. *Br J Dermatol*. 161(2):320-5.
- (23) González de Buitrago, J.M., Arilla Ferreiro, E., Rodríguez-Sesade, M., Sánchez Pozo, A. 1998. *Bioquímica Clínica*. Ed. McGraw-Hill, interamericana. 77-88.
- (24) Gramiccia M., Grandoni L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*, 35: 1169-80.

- (25) Enserink, M., 2000. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290, 1881–3.
- (26) Lindsay, D.S., Zajac, A.M., Barr, S.C., 2002. Canine leishmaniasis in the American Foxhounds: an emerging zoonosis? *Comp Cont Educ Pract Vet.* 24, 304–12.
- (27) Capelli, G., Baldelli, R., Ferroglio, E., Genchi, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., Maroli, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Rossi, L., Ruggiero, M., 2004. Monitoring of canine leishmaniasis in Northern Italy an update from a scientific network. *Parasitologia* 46, 193–7.
- (28) Gil de Mendonça P., Harsch A., Mogl C., Walther B., Boje J., Dimke C. 2011. Molecular Screening of Wild Rodents for *Leishmania infantum* in Germany. *Acta Zool. Bulg.*, 63 (3): 307-11.
- (29) Dereure J. 1999. Réservoirs des Leishmanies. In: Les Leishmanioses. Dedet J.P. ed. COLLECTION Médecine tropicale de l'AUPELF-UREF. Marketing/Ellipses:109-27.
- (30) Rioux, J.A.; Golvan YJ. 1968. Epidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France. Monographie INSERM, 37, 223pp.
- (31) Abranches P, Conceição-Silva FM, Silva-Pereira MC. 1984. Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *J Trop Med Hyg.* 87(5):197-200.
- (32) Criado-Fornelio, A., Gutiérrez-García, L., Rodríguez-Cabeiro, F., Reus-García, E., Roldan-Soriano, M.A., Díaz-Sánchez, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol.* 92, 245–51.
- (33) Mohebbali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Manouchehri Naeini, K., Avizeh, R., Fakhar, M., 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol* 29, 243–51.
- (34) Sastre N., Francino O., Ramírez O., Enseñat C., Sánchez A., Altet L. 2008. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Vet Parasitol.* 158: 117–20.
- (35) Martín-Sánchez J., Acedo-Sánchez C. Muñoz-Pérez M., Pesson B., Marchal O., Morillas-Márquez F. 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145:267-73
- (36) Solano-Gallego L., Rodríguez-Cortés A., Iniesta L., Quintana J., Pastor J., Espada Y., Portús M., Alberola J. (2007).-Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in

ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med and Hyg*, 76: 676-80.

(37) Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerg Dis*. 58, 352–57.

(38) Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J. 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*. 190(1-2):268-71.

(39) Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fúster F, Molina R. 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitology Research* (en prensa).

(40) Rolão N, Martins MJ, João A, Campino L. 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*. 12(2):183-6.

(41) Gramiccia M. 2011. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*. 181(1):23-30.

(42) Fisa R, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, Valls D, Serra T, de Colmenares M, Castillejo S, Portús M. 1997. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J Vet Diagn Invest*.; 9(1):50-5.

(43) Informe del Estado de Salud de la Población de la Comunidad de Madrid 2012. Objetivo 7. Reducir las enfermedades transmisibles. <http://www.madrid.org/>

(44) Maia C, Campino L. 2011. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol*. 27(8):341-4.

(45) Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, Mancianti F. 2002. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol*.106(3):181-91.

(46) Ayllon T, Tesouro MA, Amusatogui I, Villaescusa A, Rodriguez-Franco F, Sainz A. (2008). Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann N Y Acad Sci*. 1149:361-4.

(47) Psaroulaki A, Antoniou M, Toumazos P, Mazeris A, Ioannou I, Chochlakis D, Christophi N, Loukaidis P, Patsias A, Moschandrea I, Tselentis Y (2010). Rats as indicators of the presence and dispersal of six zoonotic microbial agents in Cyprus, an island ecosystem: a seroepidemiological study. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 104: 733–9.

(48) Killick-Kendrick, R. 1987. Studies and criteria for the incrimination of vectors and reservoir host of the leishmaniases. Proceedings of the International Workshop of Research and Control Strategies for the leishmaniases, Ottawa: 272-280.

9.- ANEXO: Fotografías de las especies animales estudiadas

9.1.- Parte teórica



Vulpes vulpes



Canis aureus



Canis lupus



Martes martes



Mustela nivalis



Lepus granatensis



Genetta genetta



Rattus rattus



Rattus norvegicus



Mus spretus



Mus musculus



Apodemus sylvaticus

9.2.- Parte práctica



Meles meles



Martes foina



Vulpes vulpes



Mustela vison



Felis silvestris



Sciurus vulgaris



Felis catus