

PREVALENCIA DE LEISHMANIOSIS CANINA EN PERROS ABANDONADOS DEL ÁMBITO PERIURBANO DE MURCIA: EVALUACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Canine Leishmaniosis prevalence in abandoned dogs of Murcia periurban areas: evaluation of different diagnostic techniques

Ortuño M.¹; * Risueño J.¹; Muñoz C.¹; Bernal A.²; Goyena E.¹; García-Galán A.¹; Berriatua E.¹; Ortiz J.¹

¹ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, España.

² Centro de Zoonosis del Ayuntamiento de Murcia, Carril Torre Molina, 110, 30009 La Albatania, Murcia, España.

***Autor para correspondencia:** María Ortuño, Email: maria.ortuno2@um.es Tel: 00 44 968 363 997, Fax: 968 364 147.

Historial del artículo:

Recibido: 23 febrero 2017

Aceptado: 24 abril 2017

RESUMEN

El presente trabajo investiga la prevalencia y la validez de técnicas de diagnóstico de la Leishmaniosis canina causada por el protozoo *Leishmania infantum*, en 43 perros abandonados del ámbito periurbano de la Región de Murcia. Esta infección, transmitida por artrópodos flebotominos, cursa en muchos animales de forma asintomática, en los que predomina una respuesta inmunológica celular sin producción de anticuerpos frente al parásito. Los perros se examinaron para detectar síntomas compatibles con la enfermedad, y se tomaron muestras de sangre y tejido linfóide (bazo, ganglio linfático y médula ósea) para analizar la presencia del parásito por microscopía óptica y cultivo *in vitro*, así como la detección de ADN parasitario mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de anticuerpos anti-*Leishmania* en suero mediante la técnica "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA). El porcentaje de perros con síntomas fue del 16%, y el de resultados positivos a las distintas técnicas diagnósticas fue 37% en la microscopía óptica, 64% a PCR, 25% al cultivo y 40% al ELISA. El porcentaje de muestras positivas a la PCR es similar al descrito en perros asintomáticos de otras zonas endémicas, mientras que el de muestras positivas por microscopía óptica y ELISA fueron superiores al

de otras zonas endémicas, incluido un estudio anterior en Murcia. Esto podría deberse a la presencia en este estudio de perros con síntomas y al elevado tiempo dedicado a la observación microscópica de preparaciones de hasta tres tejidos por animal, lo que aumentaría la sensibilidad del diagnóstico. Los resultados de este trabajo corroboran la elevada prevalencia de la Leishmaniosis en el ámbito periurbano de la Región de Murcia y la utilidad de la microscopía en el diagnóstico de la infección como una técnica que, si bien requiere experiencia del observador, es sencilla y económica.

Palabras clave: Leishmaniosis, canina, diagnóstico, endémicas, asintomáticos, Murcia.

ABSTRACT

This study investigates the prevalence and validity of diagnostic techniques of Canine Leishmaniosis (CanL), caused by the protozoan *Leishmania infantum*, in 43 abandoned dogs of periurban areas of Murcia Region. This infection, transmitted by phlebotomine sandflies, is often asymptomatic in dogs, even without antibodies production against the parasite. Dogs were examined to detect compatible symptoms. Blood and lymphoid tissue samples were taken to analyze parasite's presence by optical microscopy (OM) and in vitro culture, as well as DNA detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, and anti-*Leishmania* antibodies detection in serum with Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) technique. The percentage of symptomatic dogs was 16%, and positive results at the different diagnostic techniques were 37% at OM, 64% at PCR, 25% at culture and 40% at ELISA. The percentage of positive-PCR samples is similar to that described in asymptomatic dogs in endemic areas whereas OM and ELISA results are substantially higher than other studies in endemic areas, including a previous study in Murcia. The reasons of these results may be explained by the presence of symptomatic dogs in this study and the long time dedicated to OM imprints of up to three different tissues per animal, which raised diagnostic sensitivity. These results confirm the high prevalence of CanL in periurban areas of Murcia Region and the good sensitivity of optical microscopy in CanL diagnosis in the hands of an experienced observer.

Key words: Leishmaniosis, canine, diagnostic, endemic, asymptomatic, Murcia

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniosis canina (LC) es una enfermedad con una elevada tasa de mortalidad, causada por el protozoo *Leishmania infantum* en la Cuenca Mediterránea. Aunque otros mamíferos, incluido el hombre, pueden actuar como reservorio del parásito, el perro es el hospedador principal y más sensible a la infección (Gramiccia y Gradoni, 2005). Este protozoo se transmite casi exclusivamente mediante la picadura de un flebotomo, díptero que alberga la forma promastigote del parásito y la inocula en los tejidos del hospedador. Una vez que el sistema mononuclear fagocítico lo detecta, se encarga de captar los promastigotes, que en su interior pasarán a forma amastigote y se multiplicarán. De esta forma, cuando el macrófago esté cargado de amastigotes, se producirá la

lisis del mismo y el parásito colonizará otros macrófagos. El parásito abunda en tejido linfohematopoyético, como el bazo, los nódulos linfáticos (NL) y la médula ósea (MO), por lo que es el ideal de cara al diagnóstico etiológico de la infección. En la LC, la infección no implica necesariamente presencia de enfermedad (Solano-Gallego y Baneth, 2008; Solano-Gallego et al, 2001). Así, la prevalencia de infección es elevada, alcanzando en zonas endémicas como Murcia hasta un 67% (Chitimia et al, 2011), pero solo algunos animales desarrollan la enfermedad, cuando hay un predominio de la respuesta inmune humoral frente a la celular. Como consecuencia, se produce el depósito de complejos antígeno-anticuerpo en capilares de la piel y órganos internos, ocasionando un amplio espectro de lesiones y síntomas (Francino et al, 2006). La detección de niveles elevados

de anticuerpos tiene gran utilidad diagnóstica y pronóstica (Miró et al, 2008). La prevalencia de perros con anticuerpos anti-*Leishmania* (seroprevalencia) en zonas endémicas se sitúa en el entorno del 10-25% (Solano-Gallego et al, 2001).

Existen diversas técnicas para detectar la presencia del parásito o de los anticuerpos frente a él. Entre las más empleadas figuran la observación microscópica directa del parásito en improntas de tejidos o cultivos *in vitro*, las técnicas moleculares como la PCR, o las serológicas como ELISA o Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Sin embargo, la sensibilidad y especificidad que diversos estudios asocian a cada una de estas técnicas varía según los autores. Algunas de las técnicas directas para la confirmación parasitológica en perros asintomáticos, como el cultivo *in vitro* y la observación microscópica de improntas de tejido, presentan bajas sensibilidades (Alvar et al, 2004; Risueño et al, 2012). Por otro lado, técnicas más sensibles como la PCR tienen el inconveniente de su elevado coste, y las pruebas serológicas carecen de estandarización entre distintos laboratorios y pueden llevar a falsos resultados positivos o negativos (Gramiccia, 2011).

La Región de Murcia es una zona endémica de LC, y estudios realizados hace casi una década estimaron en un 67% la prevalencia de PCR-positivos en perros sin síntomas de enfermedad. De ellos, solamente un 7% fue seropositivo a la técnica ELISA (Chitimia et al, 2011) y solo en el 1% se demostró la presencia de amastigotes en macrófagos de improntas de bazo (Risueño et al, 2012). El objetivo de este trabajo es actualizar la situación epidemiológica de la LC en éste colectivo, analizando la prevalencia de infecciones asintomáticas y sintomáticas y comparando la validez de diferentes técnicas de diagnóstico. Se hizo un especial énfasis en analizar la utilidad de la microscopía óptica como herramienta de uso clínico rutinario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y muestras

Las muestras fueron tomadas de 43 perros callejeros entregados por sus dueños o capturados por las autoridades locales en diferentes áreas periféricas de la ciudad de Murcia. Los perros fueron eutanasiados en Centro Municipal de Zoonosis. La toma de muestras se llevó a cabo durante los meses de Febrero y Marzo de 2016, en colaboración con el equipo veterinario del Centro Municipal de Control de Zoonosis, a razón de tres días por semana. Para cada perro se rellenó una ficha con los datos demográficos y de síntomas compatibles con Leishmaniosis tras un examen del animal previo a su eutanasia. Las muestras se tomaron post-mortem incluyendo sangre en tubos de vacío sin anticoagulante, bazo, ganglios linfáticos poplíteos y una porción de 4^a-5^a costilla a nivel de la unión costo-condral.

Diagnóstico microscópico

Se realizaron improntas de bazo, NL y MO de cada uno de los 43 perros, en portaobjetos de cristal de 76 x 26 mm, que posteriormente fueron teñidas con una tinción comercial rápida (Diff-Quick®) y fijadas con DPX y un cubreobjetos de 24 x 50 mm. Estas preparaciones se observaron en el microscopio a x400 y x1000 aumentos durante 20 minutos cada una, mediante ensayo “a ciegas”, desconociendo la presencia o no de síntomas y el resultado del resto de las técnicas.

PCR a tiempo real

Se extrajo ADN de sangre y bazo de 12 y 22 perros, respectivamente, empleando un robot (Maxwell® 16, Promega) y se midió la cantidad y pureza de ADN mediante espectrofotometría con un Nanodrop (Thermo Scientific). Seguidamente, se llevó a cabo la PCR a tiempo real

con sonda TaqMan para detectar secuencias de ADN del kinetoplasto del parásito (Mary et al, 2004). En la reacción, se añadieron 250 ng de ADN de muestra y el número de ciclos empleado incluyó 1 ciclo de desnaturalización de 10 minutos a 95°C seguido de 45 ciclos, cada uno con dos pasos: uno de desnaturalización de 15 segundos a 94°C y otro de cebado y extensión de 1 minuto a 55°C. Cada muestra se realizó por duplicado y se empleó el ciclo umbral de amplificación (“threshold cycle”: CT) (momento en el que se observa amplificación en fase logarítmica) como medida semicuantitativa de la carga parasitaria (Chitimia et al, 2011).

Cultivo del parásito

Se llevó a cabo el cultivo *in vitro* para *L. infantum* en las muestras de bazo, MO y NL poplíteo obtenidas de 28 perros. Se llevó a cabo en menos de 2 horas tras su obtención y el cultivo se realizó en el medio líquido “Schneider’s *Drosophila* comercial®” (Biowest, Ref. L0207-500) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SFBI) y gentamicina (50µg/mL).

Se utilizaron placas estériles de 24 pocillos, que se llenaron con 1 ml del medio líquido. En una campana de flujo laminar, se tomó el tejido para el cultivo del interior de la muestra previamente lavada con etanol 70°. Tras disgregarla con una hoja de bisturí, se realizaron diluciones seriadas dobles y se cultivaron las placas a 26 °C. Se observaron las placas para detectar promastigotes a los 4 y 8 días tras el cultivo, partiendo de la base de que en muestras positivas lo normal es detectar promastigotes tras 3-5 días de cultivo (Marín y Martín, 1982).

Detección de anticuerpos en sangre

Para la detección de anticuerpos se recurrió a la técnica ELISA, empleando el Kit comer-

cial Ingezim Leishmania® de INGENASA. Se centrifugó la sangre de los 43 perros analizados, y el suero obtenido se empleó a la dilución 1/100. La lectura de las densidades ópticas (DO) de anticuerpos se hizo con un espectrofotómetro BioTek® ELx800 a 450 nm. Tras validar el kit siguiendo las instrucciones indicadas, se interpretaron los resultados tomando el valor del control positivo para determinar los valores de corte o cut off positivos y negativos.

Análisis estadístico y epidemiológico

Se calculó el porcentaje de positivos (prevalencia) a las distintas técnicas ELISA, PCR, microscopía óptica y cultivo. Se definió como perros enfermos aquellos con síntomas o que, aun no teniendo síntomas, presentaban densidades ópticas de anticuerpos elevadas, mayores de 0,95.

Se empleó la técnica de Chi cuadrado o, cuando fue necesario, el test de Fisher, para comparar proporciones de perros infectados y enfermos según las características demográficas. Adicionalmente, se estimó el grado de concordancia entre técnicas con el coeficiente kappa de Cohen que tiene en cuenta el efecto del azar (Thrusfield, 2007). El índice kappa varía de 0 a 1, y los valores 0-0,20, 0,21-0,40, 0,41-0,60, 0,61-0,80 y >0,81 indican un grado de concordancia insignificante, medio, moderado, sustancial y casi perfecto, respectivamente. Asimismo, se calculó la sensibilidad (Se) y especificidad (Es) relativa de las técnicas, tomando como técnica de referencia la PCR, definiendo la Se como el porcentaje de positivos por la técnica analizada, entre los animales infectados (positivos a la PCR y la Es como el porcentaje de resultados negativos entre los no-infectados (negativos a PCR) (Thrusfield, 2007). Los análisis se realizaron con el software libre R (<http://www.r-project.org/>) y se tomó como nivel de significancia el 5% ($p < 0,05$) para un test de dos colas.

RESULTADOS

Frecuencia de perros con síntomas y positivos a PCR, ELISA, microscopía óptica y cultivo parasitario, y estructura de la población analizada respecto a la leishmaniosis

Tras el examen clínico, se observaron síntomas compatibles de Leishmaniosis en el 16% (7/43) de los perros. La delgadez, linfadenomegalia, atrofia muscular, onicogrifosis, alopecia en orejas y dermatitis ulcerativa fueron los signos clínicos más frecuentes (Tabla 1). Por otro lado, el porcentaje de perros positivos a las distintas técnicas de diagnóstico fue 40% al ELISA, 64% a la PCR, 37% a microscopía y 25% al cultivo, respectivamente (Tabla 2). Esta prevalencia aumenta cuando se analizan por separado los perros con síntomas, siendo significativamente mayor que en los asintomáticos ($p < 0,05$). En los primeros, el porcentaje de resultados positivos a las pruebas de diagnóstico fue 100% a la PCR, ELISA y a

la microscopía en muestras de MO, y osciló entre 83-86% para el resto de técnicas, excepto el cultivo in vitro de tejidos individuales que se mantuvo entre 29% en muestras de bazo y 57% en MO (Tabla 2). Por otro lado, la técnica que detectó el mayor número de infecciones entre los perros asintomáticos fue la PCR en bazo (56%), seguido del ELISA (28%), la microscopía (11-24% según el tejido), el cultivo (5%); la PCR en sangre de perros asintomáticos resultó siempre negativa. El porcentaje de positivos a microscopía considerando los positivos en al menos uno de dos tejidos, alcanzó 32% para la combinación de bazo y linfonodo (Tabla 2). Finalmente, la mediana (rango) de la DO del ELISA en perros seropositivos infectados asintomáticos fue 0,73 (0,46-2,46), mientras que en los perros sintomáticos fue 1,21 (0,96-2,63).

La figura 1 describe la estructura del colectivo canino analizado respecto a su estado de infección por *L. infantum*. De un 64% de perros infectados, la prevalencia de enfermedad

Tabla 1. Frecuencia de perros con signos clínicos y síntomas observados en animales sintomáticos.

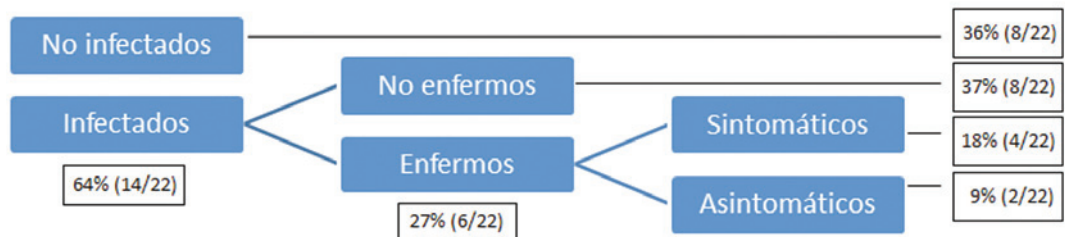
Variable	N	% perros (IC 95%)
Cualquier síntoma	43	16 (5-27)
Atrofia muscular	7	43 (6-80)
Mucosas pálidas	7	29 (0-63)
Adelgazamiento	7	67 (32-100)
Lesiones oculares	7	14 (0-40)
Onicogrifosis	7	43 (6-80)
Linfadenomegalia	7	57 (20-94)
Alopecia orejas	7	43 (6-80)
Alopecia hocico	7	14 (0-40)
Alopecia periorbital	7	29 (0-63)
Dermatitis ulcerativa	7	43 (6-80)
Dermatitis exfoliativa	7	29 (0-63)
Dermatitis pápulo-costrosa	7	29 (0-63)
Hiperqueratosis plantar	7	14 (0-40)

Tabla 2. Frecuencia de perros positivos a ELISA, PCR, microscopía y cultivo in vitro para el diagnóstico de Leishmaniosis canina.

Técnica	Muestra	% perros positivos		
		Todos (N=43)	Sintomáticos (N=7)	Asintomáticos (N=36)
ELISA	Suero	40 (17/43)	100 (7/7)	28 (10/36)
PCR	Cualquier tejido	64 (14/22)	100 (4/4)	56 (10/18)
	Bazo	64 (14/22)	100 (4/4)	56 (10/18)
	Sangre	8 (1/12)	100 (1/1)	0 (0/11)
Microscopía	Cualquier tejido	37 (16/43)	86 (6/7)	28 (10/36)
	Bazo	31 (13/42)	83 (5/6)	22 (8/36)
	MO	25 (8/32)	100 (5/5)	11 (3/27)
	Linfonodo	34 (12/35)	83 (5/6)	24 (7/29)
	Bazo y/o MO	39 (14/36)	100 (6/6)	27 (8/30)
	Bazo y/o linfonodo	42 (16/38)	86 (6/7)	32 (10/31)
	MO y/o linfonodo	45 (13/29)	100 (6/6)	30 (7/23)
Cultivo	Cualquier tejido	25 (7/28)	86 (6/7)	5 (1/21)
	Bazo	11 (3/28)	29 (2/7)	5 (1/21)
	Médula ósea	18 (5/28)	57 (4/7)	5 (1/21)
	Linfonodo	14 (4/28)	43 (3/7)	5 (1/21)

* Algunas preparaciones no se pudieron evaluar debido a defectos de tinción o escasez de células.

Figura 1. Estructura del colectivo canino analizado respecto a su estado de infección por *L. infantum*.



fue 27%, incluyendo 4 perros infectados con síntomas compatibles con Leishmaniosis y DO >0,95 en la prueba ELISA, y otros 2 perros sin síntomas pero que tuvieron DO >0,95 en la prueba ELISA. Los restantes animales infectados representaron el 37% del colectivo, caracterizados por ser PCR positivos, asintomáticos y con DO ≤ 0,95.

Sensibilidad y especificidad de las técnicas

En el grupo sintomático, todas las técnicas mostraron una Se respecto a la PCR de 100%, excepto el cultivo de muestras individuales que fue 50%, 50% y 25% para MO, NL y bazo, respectivamente (Tabla 3). Al no haber ninguna muestra PCR negativa entre los animales con síntomas, no se pudo calcular la Es de las pruebas para este grupo.

La Se en perros asintomáticos fue 50% para el ELISA, osciló entre 40% y 60% para la microscopía en muestras de bazo, MO y NL, y fue 0% para el cultivo (Tabla 3). De nuevo, la Se

de la microscopía aumentó considerablemente, a 75%, cuando se consideraron conjuntamente los resultados de cualquiera de dos tejidos distintos (Tabla 3). Por otro lado, la Es fue 100% para el cultivo, 88% para el ELISA y varió para la microscopía entre 83% en muestras de linfonodo solas o consideradas conjuntamente con bazo y MO, y 100% en las de bazo y MO (Tabla 3).

Nivel de concordancia entre técnicas

La tabla 4 muestra los coeficientes de concordancia kappa para medir el grado de concordancia entre las distintas técnicas en perros asintomáticos. Kappa fue 0% entre la PCR y el cultivo, osciló entre 0,28 y 0,36 para el ELISA y las demás técnicas y fue 0,46 para la microscopía con el cultivo y con la PCR. En la escala de valoración de dicho índice descrita anteriormente, el grado de concordancia de los índices anteriores fue nulo, medio y moderado, respectivamente.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA, la microscopía y el cultivo en el diagnóstico de la Leishmaniosis canina con respecto a la técnica de PCR, en perros sintomáticos y asintomáticos.

Técnica	Muestra	Sintomáticos (N=7)			Asintomáticos (N=36)		
		N	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	N	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
ELISA	Suero	4	100	-	18	50	88
Microscopía	Todos los tejidos	4	100	-	18	60	88
	Bazo	3	100	-	18	60	100
	Médula ósea	3	100	-	13	40	100
	Linfonodo	3	100	-	12	50	83
	Bazo y MO	4	100	-	16	75	100
	Bazo y linfonodo	4	100	-	14	75	83
	MO y linfonodo	4	100	-	10	75	83
	Cultivo	Todos los tejidos	4	100	-	7	0
Bazo		4	25	-	7	0	100
Medula ósea		4	50	-	7	0	100
Linfonodo		4	50	-	7	0	100

Tabla 4. Coeficiente kappa de concordancia entre técnicas en perros con leishmaniosis asintomática

Técnica	ELISA	PCR	Microscopía	Cultivo
ELISA	1	Medio	Medio	Medio
PCR	0,36	1	Moderado	Nulo
Microscopía	0,31	0,46	1	Moderado
Cultivo	0,28	0	0,46	1

Relación entre las variables demográficas y el estado de infección y enfermedad por *L. infantum* de los perros

El porcentaje de perros enfermos se asoció significativamente a la raza, siendo las razas puras más susceptibles a desarrollar LC que los perros mestizos ($p=0,040$) (Tabla 5). Además, aunque no fueron estadísticamente significativos, los porcentajes de perros enfermos y de perros infectados fueron mayores entre los abandonados que entre los entregados por el dueño

($p=0,336$ y $p=0,314$, respectivamente). No se observó relación entre la infección y el resto de variables demográficas (Tabla 5).

DISCUSIÓN

El presente estudio aporta información actualizada de la situación epidemiológica de la LC en el colectivo de perros del área periurbana de Murcia que fueron abandonados o entregados por sus dueños. Se confirma la elevada prevalencia de perros infectados PCR-positivos y

Tabla 5. Porcentaje de perros enfermos (síntomas o DO ELISA > 0,95) e infectados (PCR+) según las variables demográficas de los animales.

Variable	Nivel	N	% enfermos (IC 95%)	Valor P	N	% infectados (IC 95%)	Valor P
Sexo	Hembra	18	28 (7-49)	1,000	8	75 (45-100)	0,706
	Macho	25	24 (7-41)		14	57 (31-83)	
Origen	Abandonado	16	38 (14-62)	0,336	8	75 (45-100)	0,314
	Entregado	22	18 (2-34)		10	40 (10-70)	
Raza	Mestizo	25	12 (0-25)	0,040	14	57 (31-83)	0,706
	Puro	18	44 (21-67)		8	75 (45-100)	
Alzada	Grande	20	35 (14-56)	0,414	9	56 (24-88)	0,363
	Mediano	18	17 (0-34)		10	60 (30-90)	
	Pequeño	5	20 (0-55)		3	100 (100-100)	
Edad	1-3	24	25 (8-42)	0,923	13	54 (27-81)	0,320
	4-5	10	30 (2-58)		6	67 (29-100)	
	>6	9	22 (0-49)		3	100 (100-100)	

que sólo una parte comparativamente pequeña presenta signos de enfermedad (Chitimia et al, 2011; Risueño et al, 2012). Los resultados del presente estudio difieren de los anteriores en cuanto a que tanto la seroprevalencia como el porcentaje de positivos por microscopía fueron significativamente superiores.

No está claro por qué el porcentaje de perros positivos a la microscopía fue superior al del estudio de Risueño et al. (2012). En el presente estudio se emplearon improntas de hasta tres tejidos diferentes por animal, observadas durante veinte minutos cada una, y en general la calidad de las preparaciones fue muy buena. También un 16% de los perros analizados presentó síntomas y en estos animales la carga parasitaria en órganos es más elevada que en perros asintomáticos (Saridomichelakis et al, 2005; Solano-Gallego et al, 2011). La frecuencia de síntomas hallada en este estudio es similar a la denunciada en otros trabajos en España y otros países (Ruiz de Ybáñez et al, 2009; Solano-Gallego et al, 2001; Otranto et al, 2009).

También los perros con síntomas tienen una alta probabilidad de ser seropositivos y todos los sintomáticos de este estudio tuvieron elevadas DO de anticuerpos. La sensibilidad de la serología fue similar a la de la PCR en perros con signos clínicos, aunque muy inferior en los asintomáticos. Como se ha señalado anteriormente, en los perros infectados que no enferman predomina la respuesta inmunológica de carácter celular frente a la humoral (Barneth et al, 2008).

La técnica menos sensible fue el cultivo de tejido, especialmente en los perros subclínicos. Se trata de una técnica compleja de realizar, y el empleo de medios de cultivo líquidos frente al medio sólido NNN específico de *Leishmania* reduce su éxito (Gramiccia, 2011). Entre las muestras que se cultivaron, el mayor porcentaje de positivos en perros sintomáticos fue 56% en médula ósea. El cultivo celular estaría particularmente indicado para el aislamiento

de cepas de *Leishmania* y su posterior empleo por ejemplo en el ámbito de la epidemiología molecular (Schönian et al., 2011; Cortes et al, 2006).

Los resultados de este estudio tienen importantes implicaciones clínicas y epidemiológicas. El elevado porcentaje de positivos a microscopía demuestra que, en manos de un analista experimentado que emplee más de una muestra y le dedique el tiempo suficiente a cada muestra, es una herramienta que permite detectar tanto animales sintomáticos como aquellos que no presentan síntomas pero que ya están infectados, por lo que podrían desarrollarlos en un futuro próximo. En este último colectivo sería conveniente vigilar su evolución, para que en el caso de que comenzara a manifestarse el cuadro clínico, el animal pudiera beneficiarse de un tratamiento precoz. Desde el punto de vista epidemiológico, la elevada prevalencia de infección observada insta a mejorar el control de la infección, pues se ha demostrado que los animales infectados, con o sin síntomas, tienen la capacidad de transmitir el patógeno al vector (Molina et al, 1994). Esta tarea es compleja y se basa en el empleo paralelo de diversas medidas incluida la aplicación de productos repelentes frente a insectos y el tratamiento o sacrificio de animales con síntomas, colectivo que supone la mayor fuente de infección debido a su mayor capacidad de transmisión del parásito.

CONCLUSIONES

1. La prevalencia de la infección por *Leishmania* en el ámbito periurbano de Murcia analizada por PCR es elevada, aunque la mayoría de los animales no presentan síntomas externos.
2. La microscopía óptica puede llegar a tener una utilidad diagnóstica considerable si se emplea más de un tejido por animal y se le dedica el tiempo suficiente a cada preparación.

3. El aislamiento de *Leishmania* mediante cultivo es complejo y poco eficaz, por lo que no resulta práctico para el diagnóstico clínico rutinario.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con financiación del proyecto del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Ref: AGL2013-46981-R y el Instituto de Salud Carlos III dentro de la red de investigación cooperativa de enfermedades tropicales (RICET RD06/0021/1007). Se agradece también al personal del Centro Municipal de Control de Zoonosis de Murcia, por su ayuda en la recogida de muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- ALVAR J., CAÑAVATE C., MOLINA R., MORENO J., NIETO J. 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57: 1-88.
- BANETH G., KOUTINAS AF., SOLANO-GALLEGO L., BOURDEAU P., FERRER L. 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trend. Parasitol.* 24: 324-330.
- CHITIMIA L., MUÑOZ-GARCÍA CI., SÁNCHEZ-VELASCO D., LIZANA V., DEL RÍO L., MURCIA L., FISA R., RIERA C., GIMÉNEZ-FONT P., JIMÉNEZ-MONTALBÁN P., MARTÍNEZ-RAMÍREZ Á., MESEGUER-MESEGUER JM., GARCÍA-BACETE I., SÁNCHEZ-ISARRIA MA., SANCHIS-MONSONÍS G., GARCÍA-MARTÍNEZ JD., 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: 12-16.
- CORTES S., MAURICIO I., ALMEIDA A., CRISTOVÃO JM., PRATLONG F., DET JP., CAMPINO L. 2006. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol. Int.* 55: 277-283.
- FRANCINO O., ALTET L., SÁNCHEZ-ROBERT E., RODRÍGUEZ A., SOLANO-GALLEGO L., ALBEROLA J., FERRER L., SÁNCHEZ A., ROURA X. 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137: 214-221.
- GRAMICCIA M., GRADONI L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35:1169-1180.
- GRAMICCIA M. 2011. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.* 181: 23-30.
- MARÍN F., MARTÍN F. 1982. Manual para el diagnóstico de Leishmaniasis. Editum, Murcia, Spain.
- MARY C., FARAUT F., LASCOMBE L., DUMON H. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5249-5255.
- MIRÓ G., CARDOSO L., PENNSI MG., OLIVA G., BANETH G. 2008. Canine Leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part II. *Trend. Parasitol.* 8: 371-377.
- MOLINA R., AMELA C., NIETO J., SAN-ANDRÉS M., GONZÁLEZ F. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 88: 491-493.
- OTRANTO D., PARADIES P., DE CAPRARIIS D., STANNECK D., TESTINI G., GRIMM F., DEPLAZES P., CAPELLI G. 2009. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (3): 337-343.
- RISUEÑO J., BERMEJO E., MUÑOZ-GAR-

- CÍA CI., CHITIMIA I., DEL RÍO L., GARCÍA-MARTÍNEZ JD., GOYENA E., FISA R., RIERA C., JIMÉNEZ-MONTALBÁN P., MARTÍNEZ-RAMÍREZ A., MESEGUER-MESEGUER JM., MURCIA L., SEGOVIA M., BERRIATUA E. 2012. Comparative value of microscopy, serology and real time PCR in the diagnosis of asymptomatic canine *Leishmania infantum* infections. *An.Vet (Murcia)*. 28: 35-43.
- RUIZ DE YBAÑEZ R., DEL RÍO L., MARTÍNEZ-CARRASCO C., SEGOVIA M., COX J., DAVIES C., BERRIATUA E. 2009. Questionnaire survey on Canine Leishmaniasis in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 164: 124-133.
- SARIDOMICHELAKIS MN., MYLONAKIS M., LEONTIDES LS., KOUTINAS A., BILLINIS C., KONTOS VI. 2005. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 73: 82-86.
- SCHONIAN G., KUHL S., MAURICIO I.L. 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitol.* 138(4):405-25.
- SOLANO-GALLEGO L., MIRÓ G., KOUTINAS A., CARDOSO L., PENNISI MG., FERRER L., BORDEAU P., OLIVA G., BANETH G. 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit.Vectors.* 4:86.
- SOLANO-GALLEGO L., BANETH G. 2008. Canine leishmaniasis: a challenging zoonosis. *EJCAP.* 18: 232-241.
- SOLANO-GALLEGO L., MORELL P., ARBOIX M., ALBEROLA J., FERRER L. 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39: 560-563.
- THRUSFIELD, M., 2007: *Veterinary Epidemiology*, 3rd ed., Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

