

J. Cairó Vilagran
J. Font Grau

Clínica Canis
Girona

Correspondencia:
Dr. Jordi Cairó
Clínica Canis
Avda. Montilivi 17
17002 Girona

Leishmaniosis canina.
Aspectos clínicos

3

Trabajo presentado a los Premios Fundación Purina 1990

RESUMEN

Describimos el protocolo de diagnóstico, actitud terapéutica y el control de la evolución clínica que utilizamos en nuestra consulta con los perros supuestamente afectados de leishmaniosis canina.

ABSTRACT

Description of the diagnostic approach, therapy, and control of the clinical picture used in our clinic for the dogs suspected of suffering from canine leishmaniosis.

PALABRAS CLAVE

Leishmaniosis; Perro; Diagnóstico.

KEY WORDS

Leishmaniosis; Dog; Diagnosis.

INTRODUCCION

4

La leishmaniosis canina es una enfermedad parasitaria producida por un protozoo del género *Leishmania*, que afecta al perro y con menor intensidad a cánidos salvajes (lobos) zorros, roedores y al hombre^(2, 11, 22, 30, 35).

En la actualidad todavía existen mecanismos de actuación desconocidos en la patología de la leishmaniosis los cuales determinan según diversos autores pautas clínicas divergentes^(4, 16). El objetivo de este trabajo es exponer nuestros criterios prácticos sobre cuatro conceptos básicos a los que nos enfrentamos frecuentemente los veterinarios clínicos:

- Formas de presentación.
- Protocolo de diagnóstico.
- Actitud terapéutica.
- Control de la evolución clínica.

En los últimos años ha aumentado considerablemente el número de perros diagnosticados de leishmaniosis en nuestra consulta. Probablemente como consecuencia de un incremento en la difusión de esta enfermedad y un mayor conocimiento clínico de los síntomas y las lesiones que padecen los animales afectados.

En España, diferentes autores mediante métodos de tipificación enzimática, han aislado varios zimodemas en los diversos hospedadores, perteneciendo todos ellos a la especie *Leishmania Infantum*^(24, 27, 32, 34). En el perro el cuadro clínico se caracteriza por un gran polimorfismo de síntomas y lesiones. Esta variabilidad depende del grado de infestación, del estado inmunitario del hospedador, del tiempo de evolución de la enfermedad y de los órganos afectados^(4, 5).

A diferencia de lo que ocurre en la leishmaniosis humana, en la leishmaniosis canina siempre existe en mayor o menor grado una afectación visceral con o sin presencia de lesiones cutáneas. Es decir, que el parásito llega a la piel por vía hemática procedente de órganos internos^(9, 11).

La relación hospedador-parásito en el curso de una infección por leishmanias es extremadamente compleja. Depende del parásito, (cepas más o menos virulentas) y de la receptividad del hospedador (especie, raza, individuo). Los factores genéticos han sido demostrados en la rata, pero actualmente son casi desconocidos en el perro⁽⁴⁾.

La leishmaniosis es una enfermedad que produce diversas alteraciones inmunológicas en el perro: a) supresión de la inmunidad celular, que permite la multiplicación incontrolada del parásito en el citoplasma del macrófago; b) activación de la inmunidad humoral, que origina una producción elevada de inmunoglobulinas, así como la formación de inmunocomplejos circulantes, cuyo depósito puede conducir a una vasculitis y a una glomerulonefritis^(4, 29).

EXPERIENCIA CLINICA. FORMAS DE PRESENTACION

Las diferentes formas de presentación son las que dificultan de manera importante un diagnóstico clínico-laboratorial rápido y certero. Según el cuadro clínico que padecen los animales afectados, las prioridades en la elección de las diferentes técnicas de diagnóstico son absolutamente distintas^(5, 21, 28).

El diagnóstico definitivo de la enfermedad, siempre que sea posible lo basaremos en la visualización e identificación del parásito en la forma amastigote, mediante punción de médula ósea, ganglio o citología por impronta de una lesión cutánea, por su especificidad, rapidez y bajo coste.

Las diferentes formas de presentación de la Leishmaniosis canina en las zonas endémicas varían en función de los síntomas clínicos y las lesiones que padecen los animales afectados.

1. Forma clásica (Típica).
2. Forma compatible (Atípica).
3. Forma asociada (Rara).
4. Forma asintomática (Portadores).

Forma de presentación clásica (típica)

Es la forma de presentación más fácilmente diagnosticable clínica y laboratorialmente. Se presenta con un cuadro clínico en el que los síntomas y las lesiones cutáneas son manifiestos. Están caracterizadas por una dermatitis no pruriginosa localizada en la cara y región periorbital o diseminada por todo el cuerpo y sobre todo con preferencia en los salientes óseos. Generalmente estos animales, además de las lesiones cutáneas descri-

tas, presentan una sintomatología de carácter general como puede ser, abatimiento, fiebre, adelgazamiento, atrofia muscular, palidez de mucosas y síntomas asociados a una insuficiencia renal (vómitos, poliuria, polidipsia)^(5, 31).

En esta forma de presentación, el porcentaje de perros en los que se logra identificar el parásito mediante examen citológico, es muy elevado. La punción de médula ósea en la unión costo-condral entre la 6ª y 10ª costilla, es poco dolorosa y de fácil realización en los animales de un peso superior a los 5 kilos, por lo que en nuestra opinión, es la técnica que mejores resultados ofrece. En menor cuantía pueden evidenciarse las formas amastigote de leishmanias en las punciones ganglionares y en las improntas cutáneas^(3, 18).

Forma de presentación compatible (atípica)

En esta forma de presentación, el cuadro clínico es más discreto y de menor intensidad. Los síntomas y las lesiones pueden ser característicos de la leishmaniosis, pero también de otras enfermedades, por lo cual debemos incluir siempre la leishmaniosis en los protocolos de diagnóstico diferencial, en aquellos animales en cuya anamnesis hayamos constatado que viven o han vivido en una zona endémica. En España se consideran áreas de alta endemicidad todas las provincias Mediterráneas, el Valle del Ebro, Andalucía y la Zona Centro. Pero debemos recordar que debido a los desplazamientos estacionales —en verano— de la población, puede ser diagnosticada en cualquier lugar. Por eso en los animales que habitan en zonas no endémicas, es muy importante realizar una anamnesis completa, al igual que conocer los principales síntomas y formas de presentación de esta enfermedad^(27, 32, 34).

Síntomas y lesiones cutáneas^(5, 9, 23)

- Alopecias y descamaciones con caída abundante del pelo extratempóreamente con piel seca y áspera.
- Ulceras cutáneas en áreas próximas a las articulaciones y en las zonas mucocutáneas.
- Síndrome seborreico.

- Nódulos cutáneos dispersos.
- Piodermas.
- Pododermatitis y perionixis.
- Hiperqueratosis plantar.

Síntomas y lesiones renales^(13, 25)

- Nefritis intersticial crónica.
- Glomerulonefritis proliferativas (membranosa o mesangial).
- Amiloidosis renal.
- Riñón terminal.

Estas lesiones conducen a un cuadro con proteinuria, síndrome nefrótico o a una insuficiencia renal franca, con uremia.

La biopsia renal es el método más específico para establecer diagnóstico, tratamiento y emitir un pronóstico más fiable de la evolución clínica en las lesiones renales producidas por la leishmania.

Es importante utilizar técnicas de inmunoperoxidasas para visualizar de forma específica las leishmanias en el caso que se hallen en el parénquima renal⁽¹⁰⁾. También es conveniente emplear técnicas de inmunohistoquímica para poder precisar con mayor exactitud las lesiones a nivel del glomérulo renal.

Síntomas y lesiones del sistema linfático y hematopoyético^(5, 34)

- Adenopatías localizadas y/o generalizadas.
- Esplenomegalia.
- Anemia no regenerativa, epistaxis (a veces muy precoz).

Síntomas y lesiones digestivas^(5, 21, 23)

- Intestino: Diarrea crónica (enteritis granulomatosa). Heces con melena (enteritis hemorrágica).
- Hígado: Inflamación crónica (hepatitis). Insuficiencia hepática (cirrosis).

Síntomas y lesiones oculares^(20, 29, 23)

- Párpados: Blefaritis.
- Conjuntiva: Conjuntivitis nodular.

6

- Córnea: Queratitis.
- Cámara anterior: Uveítis.
- Retina: Coriorretinitis. Hemorragias en la retina.

Estas lesiones inflamatorias pueden evolucionar apareciendo complicaciones en forma de:

- Ulceras.
- Queratoconjuntivitis seca.
- Cataratas.
- Glaucoma.

Síntomas y lesiones del aparato locomotor⁽³⁶⁾

- Cojeras.
- Artritis y poliartritis.
- Periostitis, proliferación perióstica y focos de osteolisis en los huesos de carpo y tarso.

A veces es difícil discernir si las cojeras son debidas a las lesiones óseas o a las alteraciones de los cojinetes plantares (hiperqueratosis) y las uñas ya que un proceso inflamatorio en estas zonas puede ser muy doloroso.

Síntomas y lesiones del aparato reproductor^(5, 34)

- En el macho orquitis —esterilidad.
- En la hembra esterilidad —infecundidad.

En las hembras con leishmaniosis que padecen un cuadro clínico poco importante o son asintomáticas, la gestación produce un aumento en número e intensidad de los síntomas clínicos y las lesiones, siendo entonces más propensas a sufrir una anemia e insuficiencia renal. Por ello es muy difícil en un criadero canino superar la leishmaniosis manteniendo la faceta reproductiva.

El polimorfismo y los fenómenos inflamatorios crónicos son dos de las características principales de las leishmaniosis, en este apartado hemos agrupado las diferentes formas de presentación compatibles con los síntomas y las lesiones de otras enfermedades. Tenemos que reconocer que si los cuadros clínicos son muy localizados, será más difícil clínicamente sospechar de una leishmaniosis (ej. uveítis unilateral). Pero si los síntomas y las lesiones afectan a varios aparatos o sistemas, será más fácil intuir clínicamente la posibilidad de que la causa etiológica de un cuadro clínico sea una leish-

maniosis (ej. uveítis anterior + infarto ganglionar generalizado + insuficiencia renal).

Forma de presentación asociada (rara)

La leishmaniosis, al igual que la mayoría de las enfermedades parasitarias, puede presentarse asociada a otros procesos patológicos de diferente etiología, por lo cual es de gran importancia clínica el realizar una correcta exploración y una analítica completa para conocer si además de las enfermedades citadas a continuación existe una leishmaniosis o viceversa, ya que el tratamiento y el pronóstico clínico se diferencian de forma ostensible^(3, 5, 11).

- Hipotiroidismo.
- Ehrlichiosis canina.
- Filariosis.
- Sarna demodéica.
- Infecciones bacterianas cutáneas.
- Piroplasmosis.
- Tumores linfoides.

Estas enfermedades son las que con mayor frecuencia pueden asociarse a la leishmaniosis, presentando un diagnóstico mucho más difícil, como consecuencia de la variación de los síntomas clínicos y las lesiones.

Forma de presentación asintomática (portadores)

Son formas latentes asintomáticas, difíciles o casi imposibles de sospechar clínicamente, pues en ellas se produce una carencia total de síntomas clínicos (para afirmar esto, debemos explorar de forma ordenada, completa y sistemática al animal).

Estos perros se comportan como portadores y actúan de reservorio del parásito.

Frecuentemente son diagnosticados cuando se realiza un sondeo epidemiológico en el entorno de un perro enfermo o bien se realizan diagnósticos precoces de forma sistemática en una zona endémica^(24, 27, 32).

La mayoría de estos perros desarrollan la leishmaniosis en un periodo muy variable que va de tres meses a varios años⁽²⁻¹⁰⁾. Otros animales presentarán la enfermedad cuando de forma accidental se produce un estrés (fractura, gestación) o su-

fren una inmunodeficiencia sea natural (linfoma) o yatrogénica (tratamientos inmunosupresores, corticoides).

Hay un porcentaje pequeño (1-5 % aproximadamente) de perros que superan la infección de forma completa sin medicación alguna. Son lo que se denomina curaciones resolutivas espontáneas^(4, 31).

Existe el peligro de confundir animales enfermos de leishmaniosis (clínica y laboratorialmente positivos) con perros serológicamente positivos, pero que actualmente no padecen la enfermedad y ya la hayan superado.

PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO

TECNICAS DE LABORATORIO

Las pruebas de laboratorio que nosotros utilizamos para el diagnóstico son:

- Microhematócrito-refractometría.
- Punción en médula ósea o ganglio linfático.
- Proteinograma.
- I.F.I.
- Biopsia cutánea.

Microhematócrito-refractometría

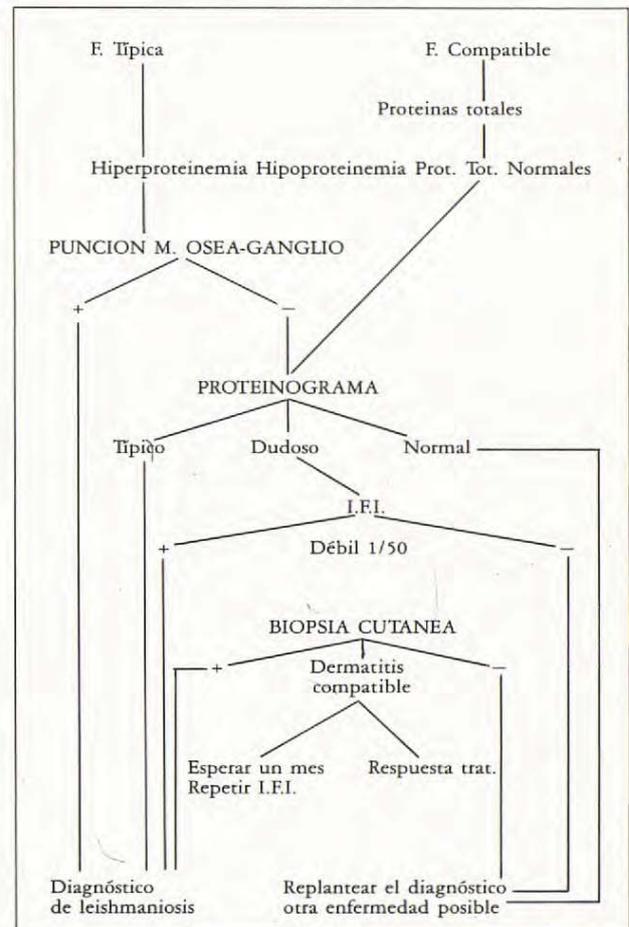
Primero realizamos el microhematócrito. La gota de suero obtenido la depositamos en un refractómetro ocular que determina de forma aproximativa y rápida las proteínas totales en la sangre.

La anemia asociada a una hiperproteïnemia, constituye un dato de gran valor orientativo.

Punción medular ósea-ganglio

La punción de médula ósea la realizamos con el animal en decúbito lateral, introduciendo de forma oblícua en dirección ventrodorsal, una aguja hipodérmica (9 x 25) en el extremo distal de la parte ósea de la costilla, donde la cortical externa es de menor espesor y la parte central es rica en médula ósea. A continuación realizamos una aspiración, extensión en un porta y tinción con el método Diff-Quik (R) para su posterior visualización en el microscopio.

Si el animal presenta adenopatía generalizada es más fácil realizar una punción ganglionar en la zona cortical. (G. poplíteo).



Esquema 1. Protocolo de diagnóstico de leishmaniosis en zonas endémicas.

Proteinograma

La electroforesis de las proteínas séricas sobre acetato de celulosa conduce al diagnóstico de la leishmaniosis siendo prácticamente la única enfermedad en la que las variaciones del proteinograma son particularmente indicativas, precediendo siempre a la aparición de los síntomas clínicos. Además permite establecer un pronóstico y guiarnos

8

durante el tratamiento. Consideramos un proteínograma típico de leishmaniosis cuando en un perro con síntomas y lesiones característicos presenta una hiperproteïnemia superior a 85 g/l, un descenso de las albúminas y un elevado incremento de las globulinas, siendo la relación A/G igual o inferior a 0,4. Así pues la hipergamaglobulinemia es una característica constante.

Para que los datos obtenidos sean válidos, hace falta un suero no hemolizado y que el animal en los últimos quince días no esté bajo los efectos de los corticoides.

I.F.I.

La inmunofluorescencia indirecta determina la tasa de anticuerpos antileishmanias. La técnica ELISA es de igual o mayor fiabilidad que la inmunofluorescencia. Nosotros consideramos como negativos con I.F.I. a los títulos inferiores a 1/50, dudosos los títulos de 1/50, positivos los títulos de 1/100 o superiores. Es conveniente controlar periódicamente la repetibilidad y fiabilidad del laboratorio que nos realiza esta técnica^(7, 19, 27, 34).

La tasa de anticuerpos no sirve para emitir un pronóstico de la enfermedad ni para controlar la evolución clínica⁽²⁴⁾.

Los animales inmunodeprimidos pueden dar falsos negativos, en especial con las técnicas serológicas (I.F.I., ELISA). En medicina humana existen reacciones cruzadas de interferencia entre las leishmaniosis y las siguientes enfermedades: paludismo, tripanosomiasis, tuberculosis y lepra, dando falsos positivos⁽³⁰⁾.

En el perro por el contrario ni la piroplamosis ni la ehrlichiosis dan reacciones cruzadas con la leishmaniosis^(7, 12).

Pruebas de laboratorio:

A) Función de la rapidez y el precio de coste .

	Tiempo	Precio/Ptas.
Punción M. ósea-ganglio	10'	50
Proteinograma	1 día	1.000
I.F.I.	2-6 días	1.200
Biopsia cutánea	4-8 días	4.000

B) En función de la especificidad

Resultado	Positivo	Negativo
Punción M. ósea-ganglio	****	*
Biopsia cutánea	****	**
I.F.I.	***	***
Proteinograma	***	****

El protocolo de diagnóstico debemos interpretarlo con criterios amplios y flexibles, sobre todo a la hora de establecer las prioridades en el tipo de pruebas de laboratorio a realizar.

ACTITUD TERAPEUTICA

Existen varios protocolos de tratamiento con diferentes medicamentos, dosis, frecuencia y vías de administración^(14, 26).

Los derivados del antimonio constituyen, desde hace cuarenta años, la terapia base de la leishmaniosis canina. Existe cierta ambigüedad en el cálculo de la posología, estudios de la biodisponibilidad han demostrado una rápida eliminación por el riñón. (90 % de eliminación renal en 8 horas). Por eso algunos autores preconizan el fraccionamiento de la dosis diaria. Por el contrario en los casos de insuficiencia renal la dosis total debe ser reducida⁽²⁵⁾.

Antimoniales-Antimoniato N-metil glucamina (Glucantime)

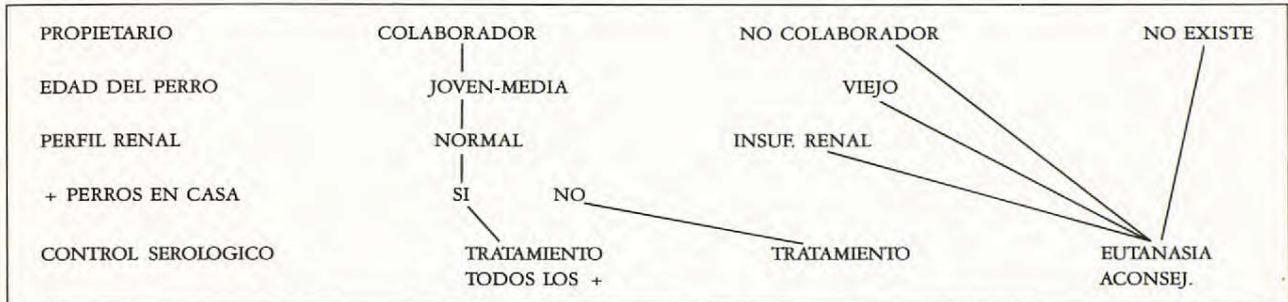
Glucantime® en ampollas de 5 ml es una solución al 33 % de antimoniato N-metil glucamina, es decir 5 ml de glucantime® = 1.500 mg de antimoniato N-metil glucamina⁽⁸⁾.

— O.M.S. (Hombre) 200 mg/kg/día-20 días. Dosis máxima 850 mg/día.

— Perro de 100 mg/kg/día (1ª serie 30 días, 1 semana de descanso y una 2ª serie de 20 días.

CONTROL DE LA EVOLUCION CLINICA

El éxito de la terapéutica está basado en parte, en la realización de controles periódicos de las va-



Esquema 2. Consideraciones sobre el tratamiento en la leishmaniosis canina.

riaciones de las proteínas séricas. Las alteraciones en el proteinograma, preceden casi siempre a la reaparición de la sintomatología clínica, y a la elevación de la tasa de anticuerpos^(17, 19).

PAUTA CLINICA

1. Proteinograma de referencia al iniciar la primera serie de tratamiento.
2. Tratamiento con Glucantime I.M. 100 mg/kg/24 horas/30 días.
3. 1 semana de descanso si remite la sintomatología clínica, sino realizar una nueva serie de 20 días.
4. Proteinograma de control.

NORMALIZADO	PATOLOGICO
Control cada 3 meses el 1º año	Otra serie de 20 días de tratamiento
Cada 5 los sucesivos	Proteinograma al mes

Evitar la reproducción en hembras. El Glucantime no tiene efectos teratógenos demostrados, pero la gestación acelera habitualmente la recidiva de la enfermedad.

Las primeras recaídas se producen entre los 3-8 meses de finalizar el primer tratamiento.

Para volver a restablecer la normalidad en las recidivas, la duración de los tratamientos es menor (10-15 días) que en el primero de ellos^(7, 8, 14, 30).

En el supuesto de que el perro viva en una zona endémica de leishmaniosis es imposible diferenciar entre reinfestación y recidiva.

DISCUSION

Nos encontramos ante la imposibilidad de hablar en términos estadísticos de la leishmaniosis porque los animales que recibimos en nuestra consulta son una muestra sesgada y no representativa del total de la población canina de la región.

En zonas endémicas existe el peligro de confundir la leishmaniosis con otras enfermedades cutáneas y viscerales, en especial si nos basamos únicamente en la sintomatología clínica que padece el animal. En estos casos el error en el diagnóstico puede provocar la muerte del perro. Es lo que nosotros denominamos como «Síndrome leishmanias del Veterinario», como por ejemplo confundir una pioderma bacteriana, o una intoxicación por dicumarinas con una leishmaniosis.

En las diferentes formas de presentación de la leishmaniosis debemos contemplar la posibilidad de que se presente asociada a otros procesos patológicos (hipotiroidismo, filariosis, S. demodécica). El tratamiento unilateral de una de las dos puede ser la causa del fracaso de la terapéutica.

En las formas de presentación clínica la dicotomía, forma visceral/forma cutánea, la consideramos poco acertada ya que coincidimos con varios autores^(4, 11) en que siempre existe una afectación visceral en la leishmaniosis canina.

En el año en curso ha sido comercializado un test de diagnóstico rápido para la detección de anticuerpos ante *Leishmania infantum* de gran simplicidad técnica, lo cual nos permite realizarlo en la propia consulta y disponer de los resultados aproximadamente en 60 minutos. Actualmente nosotros no disponemos de un número suficiente

10

de datos contrastados con otras técnicas para poder evaluar con rigor la fiabilidad y el tipo de ayuda que puede prestar este test para el veterinario clínico, en una zona endémica.

La bibliografía consultada es confusa y a veces contradictoria sobre las dosis de antimoniales, las pautas de administración (24/48 horas), la duración de los tratamientos y especialmente en la conveniencia de administrar o no corticosteroides asociados a las drogas antimoniales^(25, 30).

Nosotros aconsejamos la eutanasia de los perros en los que la leishmaniosis canina está asociada a una insuficiencia renal, aunque en casos aislados en los que el propietario se muestra reacio al sacrificio del animal, asociamos los dos fármacos anteriores. Con este protocolo hemos obtenido algunas supervivencias superiores a los tres años desde el diagnóstico de la enfermedad.

Según algunos autores⁽¹⁴⁾ la utilización de drogas antimoniales reduce el riesgo de transmisión de la leishmaniosis y los animales así tratados no actúan como reservorio del parásito.

En zonas enzoóticas hay que ser prudente con la administración de corticoesteroides a dosis inmunosupresoras en perros sin un diagnóstico etiológico seguro. Si existe una leishmaniosis en fase subclínica, ésta se desarrollará con gran agresividad (Ej: confundir una leishmaniosis con un penp-

higus). Es por lo que debemos realizar siempre un diagnóstico diferencial y un control periódico a todos los animales que mantengamos por necesidades terapéuticas inmunodeprimidos.

Debemos tener presente cada vez más la posibilidad de que la leishmania se comporte como un parásito oportunista en animales inmunodeprimidos. Esta posibilidad ha sido descrita en medicina humana con enfermos infectados por el VLTH-III en los que la causa de su muerte fue la leishmaniosis visceral y frente a la cual se encontraron completamente indefensos y no reaccionaron favorablemente con ningún tratamiento^(1, 6).

El examen citológico de la médula ósea para intentar evidenciar la presencia de formas amastigotes de leishmania, es a nuestro entender la mejor técnica de diagnóstico, (aproximadamente 80 % de positivos). Por el contrario no debemos utilizar esta técnica para el control de la evolución clínica de la enfermedad, debido a que después de una primera serie de tratamiento con drogas antimoniales los frotis son casi siempre negativos aunque todavía existan leishmanias en el organismo.

En el caso de que no exista una respuesta favorable al tratamiento debemos revisar el diagnóstico; evaluar la función renal, hepática y valorar la posibilidad de la existencia de otra enfermedad asociada.

BIBLIOGRAFIA

1. Borado, J. La leishmaniosis visceral como infección oportunista. *The Lancet* (Ed Esp) 9, 2, 647-648, 1986.
2. Botet Fregola, J. La leishmaniosi a l'Espanya Peninsular. Recull historic. Tesina de Llicenciatura. *Facultat de Farmacia de Barcelona*. 1985.
3. Bourdeau, P. Eléments pratiques du diagnostic de la leishmaniose canine. *Le Point Vétérinaire*. 43-50, 1983.
4. Bourdeau, P. Eléments de la relation hôte-parasite au cours de l'infection leishmanienne et conséquences. *Pratig. médic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie*. 57-72, 198r8.
5. Cabassu, J.P., Gervais, P., Seguret et N. Manifestations Clinique de la leishmaniose canine. *Pratig. médic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie*. 23, 29-34, 1988.
6. De la Loma, A., Alvar, J., Galiano, E.M., Blasquez, J., Muñoz, A., Najera, R. Leishmaniosis or AIDS? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 421, 1985.
7. Dunan, S. Interprétation des résultats biologiques dans les leishmanioses humaines et canines. *Rec. Méd. Vét.* 154, 3, 251-261, 1978.
8. Euzeby, J. Thérapeutique actuelle et nouveau concepts. *Pratig. médic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie*. 23, 103-110, 1988.
9. Ferrer, L., Rabanal, R., Fondevila, D., Ramos, J.A., Domingo, M. Skin lesions in canine leishmaniosis. *J. Small Animal Pract.* 29, 381-388. 1988.
10. Ferrer, L., Rabanal, R., Domingo, M., Ramos, J.A., Fondevila, D. Identification of leishmania amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Research in Veterinary Science*. 44, 1988.

11. Ferrer, Ll. Leishmaniosis canina en España: datos para el clínico. *Enfermedades Infecciosas*. n.º 2087 Editorial, 1989.
12. Giauffret, A., Sanchis, R., Vitu, C. Les examens de laboratoire dans la leishmaniose canine. *Revue Méd. Vét.* 127, 6, 913-930, 1976.
13. George, J.W., Nielsen, S.W., Shively, J.N., Hoper, S., Mroz, S. Canine leishmaniasis with Amyloidosis. *Vet. Pathol.* 13, 363-373, 1976.
14. Gradoni, M., Maroli, M., Gramiccia and Mancianti F. Leishmania infantum infections rat in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medical and Veterinary Entomology*. 1, 339-342, 1987.
15. Groulade, P. L'électrophorèse des protéines sériques dans la leishmaniose canine. *Rev. Med. Vet.* 701-706, 1983.
16. Groulade, P. Editorial *Pratiqu. medic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23, 2, 1988.
17. Groulade, P. L'intérêt de l'électrophorèse des protéines sériques dans le bilan et le suivi au cours de la Leishmaniose canine. *Pratiqu. medic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23, 93-101, 1988.
18. Groulade, P., Bourdeau. Moyens pratiques de mise en évidence des Leishmanies. *Pratiqu. medic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23, 73-79, 1988.
19. Haas, P., Ozon, C., et Bayada, M. Expression standardisée des résultats dans la sérologie de la Leishmaniose canine. Application a la réaction d'elisa. *Pratiqu. medic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23, 89-92, 1988.
20. Henriquez, A.S., Prats Esteve, A. Leishmaniose oculaire chez le chien. *Pratiqu. medic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23, 217-220, 1988.
21. Keenan, C.M., Hendrickss, L.D., Lightner, L., Webster, H.K., Johnson, A.J. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.* 21, 74, 1984.
22. Lanotte, G., Rioux, J.A., Perieres, J., Vollhardt, Y. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. In *Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. Annales de Parasitologie.* 277-295, 1979.
23. Longstaffe, J.A., Jefferies, A.R., Kelly, D.F., Bedford, P.G.C., Herrtage, M.E., Darke, P.G.G. Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human health hazard. *J. small Anim. Pract.* 24, 23, 1983.
24. Martínez, M.S., Gómez, C., Martínez, A., Prieto, A. Relaciones entre proteinograma y serología en la leishmaniosis canina. *V Congreso Nacional de Parasitología.* Salamanca 275-276, 1987.
25. Naskidachville, L., Peroux, F. La pathologie rénale chez le chien Leishmanien. *Pratiqu. medic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23, 43-47, 1988.
26. Ogunkolade, B.W., Vouldoukis, I., Frommel, D., Davoust, D., Rhodes-Feuillette, A., Monjour, L. Immunization of dogs with a Leishmania infantum-derived vaccine. *Vet. Parasitol.* 28, 33-41, 1988.
27. Portús, M., Fisa, R., Serra, T., Gállego, M., Mora, E. Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. *Med. Vet.* 4, 11, 569-575, 1987.
28. Pospischil, A., Isabell Fiebiger, H.E., Krampitz, G., Weiland. Experimentelle Infektion mit Leishmanien beim Hund: Klinische, pathologische, parasitologische und serologische Befunde. *Vet. Med.* B 34. 288-304. 1987.
29. Puchol, J.L., González, J.L. Leishmaniosis ocular. Afecciones del segmento anterior. *Congreso Nacional AVEPA.* Madrid. 115-121, 1989.
30. Quilici, M., Toga, I., Dunan, S., Dumon, H. La leishmaniose viscérale humaine. Clinique, diagnostic, traitement. *Pratiqu. medic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23, 21-27, 1988.
31. Rioux, J.A., Lanotte, G., Pratlong, F., Dereure, J., Jarry, D., Moreno, G., Killich-Kendrick, R., Perieres, J., Guilvard, E., Belmonte, A., Portus, M. La leishmaniose cutanée autochtone dans le Sud-Est de la France. Resultats d'une enquête écoépidémiologique dans les Pyrénées-Orientales. *Méd. Mal. Infect.* 650-656, 1985.
32. Reyes, A., Morillas, F., Valero, A., González J., Benavides, I., Sanchis, M.C. Encuesta sobre la leishmaniosis canina en las comarcas naturales de la provincia de Granada (Sur de España). *Rev. Ibér. Parasitol.* 48, 3, 233-240, 1988.
33. Roze, M. La Leishmaniose et l'oeil. *Pratiqu. medic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 49-55, 1988.
34. Tesouro, M., Jiménez, F., Rodríguez, M., Fragio, L., Rodríguez, F. Evolución del número de casos de leishmaniosis canina en Madrid y otras provincias. Proceedings of the XIII Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Barcelona 1988.
35. Trigo, M. Leishmaniosis canina. Su estudio clínico: Contagiosidad a la especie humana. *Revista Veterinaria de España.* X, 5, 242-250, 1916.
36. Turel, J., Pool, R. Bone lesions in four dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Radiology* 23, 6, 243-249, 1982.