

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado: Genética y Evolución



Facultad de Farmacia

Departamento de Parasitología

Estudio cuali-cuantitativo y molecular de los principales vectores de *Leishmania infantum* y *Leishmania tropica*, en España: Construcción y evaluación de mapas de riesgo como herramienta para el control de la Leishmaniosis.



Memoria que presenta el Licenciado en Biología Sergio David Barón López
para aspirar al Grado de Doctor Internacional.

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sergio David Barón López
D.L.: GR 1992-2014
ISBN: 978-84-9083-192-2

Francisco Morillas Márquez y Joaquina Martín Sánchez, Catedráticos del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

Informan que:

El trabajo de investigación que se expone en la Tesis Doctoral titulada: **“Estudio cuali-cuantitativo y molecular de los principales vectores de *Leishmania infantum* y *Leishmania tropica*, en España: Construcción y evaluación de mapas de riesgo como herramienta para el control de la Leishmaniosis”**, ha sido realizado bajo su dirección conjunta por el licenciado en Biología por la Universidad de Granada, Sergio David Barón López, y lo encuentran conforme para ser presentado y aspirar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Granada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmamos el presente informe en Granada a 5 de Mayo de 2014.

Fdo.: Francisco Morillas Márquez

Fdo.: Joaquina Martín Sánchez

Francisco Morillas Márquez y Joaquina Martín Sánchez, Catedráticos de la Universidad de Granada,

AUTORIZAN la presentación de la Tesis Doctoral “**Estudio cuali-cuantitativo y molecular de los principales vectores de *Leishmania infantum* y *Leishmania tropica*, en España: Construcción y evaluación de mapas de riesgo como herramienta para el control de la Leishmaniosis**” para su defensa, e informan que cumple todos los requisitos legales.

En Granada, a 5 de Mayo del 2014

Fdo.: Francisco Morillas Márquez

Fdo.: Joaquina Martín Sánchez

El catedrático D. Francisco Javier Adroher Auroux, Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

AUTORIZA la presentación de la Tesis Doctoral **“Estudio cuali-cuantitativo y molecular de los principales vectores de *Leishmania infantum* y *Leishmania tropica*, en España: Construcción y evaluación de mapas de riesgo como herramienta para el control de la Leishmaniosis”**, de la que es autor Sergio David Barón López, para optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Granada.

En Granada, a 5 de Mayo de 2014.

Fdo.: Francisco Javier Adroher Auroux

El doctorando Sergio David Barón López, y los directores de la tesis Francisco Morillas Márquez y Joaquina Martín Sánchez

Garantizamos que:

Al firmar esta Tesis Doctoral, el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 5 de Mayo del 2014

Director/es de la Tesis

Fdo.: Francisco Morillas Márquez

Fdo.: Joaquina Martín Sánchez

Doctorando

Fdo.: Sergio David Barón López

Agradecimientos...

Es muy difícil enfrentarse a esta página en blanco cuando miras hacia atrás y te das cuenta de todo el camino andado hasta llegar a este punto, pues mucho es lo que hay que agradecer y pocas las palabras para poder hacerlo. No hay nada mejor para empezar que intentar hacerlo por el principio, ya que no sería de justicia olvidar que “el agradecimiento es la parte principal de un hombre de bien” (Francisco de Quevedo) y que “de gente bien nacida es agradecer los beneficios que recibe” (Miguel de Cervantes).

En primer lugar quisiera dar las gracias a mis directores, Francisco Morillas Márquez y Joaquina Martín Sánchez (Paco y Joaqui), por enseñarme lo que es ser un buen científico, lo que debo y lo que no debo hacer, siempre animándome a avanzar y haciéndome sentir que no soy un simple doctorando, sino uno más del gran grupo de investigación en el que me he formado. Sin ellos y sin su apoyo la realización de esta tesis nunca podría haberse llevado a cabo. “El profesor mediocre dice. El buen profesor explica. El profesor superior demuestra. El gran profesor inspira” (William Arthur Ward).

Quisiera también hacer una mención especial a Fernando Franco por su inestimable colaboración a la hora de realizar uno de los artículos de esta tesis, y agradecer tanto el tiempo compartido en el desarrollo de esta investigación como la gran relación de amistad que pudimos entablar.

No quiero perder la ocasión para darles también mi más sincero agradecimiento a Margarita Campos y Josefa Maldonado, pues gracias a ellas tuve la oportunidad de entrar en el departamento de Parasitología, y a Adela Valero ya que, aún sin ser mi directora, me ha acompañado durante todo este tiempo ofreciéndome su experiencia y sus sabios consejos. Muchas gracias a Victoriano Díaz, Santiago Hidalgo y Manuel Morales por vuestra excelente amistad y ayuda en todos mis años de investigación. También quiero dar las gracias al resto de los integrantes de esa gran familia en la que he estado integrado durante todos estos años: Rocío Benítez, Javier Adroher, Luis Hueli, Inmaculada Mañas, Marina Jiménez, Amparo Soler, Herminia Gijón e Isabel Ruiz; y a mis compañeros y amigos: Nacho, Pili, Magdalena, Víctor, David y Lola. Quisiera aprovechar estas líneas para agradecer al Dr. José Luis Rosales que me acogiera en su laboratorio para realizar mi estancia internacional en México DF, así como a la Dra. Patricia Talamás, Lidia, Alondra, Sonia, Pancho, Alejandro, Paty Espiritu, Paty Pulido, Marisol, Enrique y todos los miembros del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (CINVESTAV), por hacerme sentir como en casa además de ayudarme en todo lo que necesité. Espero no

haberme dejado a nadie en el tintero, pero si fuera así que se sientan aludidos al decirles a todas y cada una de las personas que he tenido el placer de conocer en este periplo de mi vida, mil gracias.

A pesar de la alegría que me da el poder concluir esta etapa para empezar otras nuevas, queda conmigo la pena de que no pueda estar presente alguien al que le hubiera gustado estar y que me ayudo para la realización de mi tesis, alguien con el que compartí gratos momentos y me regaló su amistad, alguien que por desgracia dejó este mundo pero cuya esencia sigue entre nosotros, alguien que con su marcha me dejó clavada una espina aunque me sigue acompañando en mis recuerdos. Allí donde estés, José Antonio, muchas gracias por todo.

Quiero dar especialmente las gracias a mis padres, Antonio y Encarna, pues han sido ellos con sus cuidados, con su cariño, con sus valores y enseñanzas, y con su esfuerzo y dedicación, los que me han convertido en el hombre que soy hoy día. Todo lo que soy y lo que puedo llegar a ser se debe en gran parte a ellos, y solo espero que se sientan orgullosos de mí al igual que yo lo estoy de que sean mis padres. No quiero olvidarme de mis hermanos, Eva y Jose, y mis sobrinos, Joel y Ainhoa, ya que me han dado la familia que toda persona desearía tener y me han apoyado con su cariño siempre que lo he necesitado.

Por último quiero darle las gracias a Manme, mi amiga, mi confidente y mi apoyo en los momentos más difíciles. Rabindranath Tagore dijo: *“Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que, constante y paciente, la sostiene en la sombra”*, si he llegado hasta aquí es gracias a su ayuda, ya que me ha dado aire cuando me ahogaba, sustento cuando me caía y ánimo cuando más lo necesitaba, ha sido el pie del candil que ha hecho posible que pueda brillar mi luz.

Muchísimas gracias a todos.

La presente investigación ha sido subvencionada por:

*La **Unión Europea** mediante la beca de estudiante con cargo al proyecto “EDEN: Emerging Diseases in a changing European eNvironment” (Contract nº 010294-2).*

*El **Ministerio de Ciencia e Innovación** a través del proyecto “Bioecología de los flebotomos en el sur de España” (Ref. CGL2007-66943-C02-02/BOS).*

*La **Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía** con el proyecto “Estudio epidemiológico y profiláctico de dos parásitos emergentes: Leishmaniosis y Anisakidosis” (Ref. P07-CVI03249)*

*El **Grupo de Investigación de la Junta de Andalucía BIO 176.***

*El **Banco Santander** ha financiado la estancia internacional mediante la Beca de Movilidad “Formula Santander”.*

Mi más sincero agradecimiento a estas entidades por sus respectivas aportaciones.

*“Mientras el río corra, los montes hagan sombra y
en el cielo haya estrellas, debe durar la memoria del
beneficio recibido en la mente del hombre agradecido”*

(Virgilio)

Resumen:

El sur de la provincia de Granada presenta, en pocos kilómetros de distancia, altitudes que comprenden entre 0 y 3.480 m de altitud, por lo que posee diversos matices bioclimáticos con diferentes características medioambientales y de vegetación en un rango geográfico estrecho. Esta característica unida al hecho de que se trata de una zona endémica de leishmaniosis producida por *Leishmania infantum*, y a la amplia distribución de sus principales vectores, *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, la hace adecuada para realizar un estudio cuali-cuantitativo y molecular de las poblaciones de estos dípteros, así como para comprobar la asociación entre su presencia/ausencia y variables de tipo ecológico, geográfico y climático. *Phlebotomus sergenti*, el principal vector de *Leishmania tropica*, está ampliamente representado en España, mientras que *L. tropica* no es una especie endémica en nuestro país. Sin embargo: el importante flujo migratorio humano desde zonas donde esta parasitosis es endémica, la existencia del vector y el ciclo antroponótico del parásito, podrían permitir su establecimiento en España, de forma similar a lo ocurrido en el norte de Marruecos. Por este motivo es interesante realizar un estudio similar al realizado con los vectores de *L. infantum*. Por lo tanto, en el presente trabajo se han perseguido los siguientes objetivos generales: El estudio de las poblaciones de flebotomos presentes en el sureste de España, prestando especial atención al análisis cuali-cuantitativo y molecular de los principales vectores de *Leishmania infantum* (*P. perniciosus* y *P. ariasi*) y *Leishmania tropica* (*P. sergenti*); y la determinación de los parámetros que condicionan la distribución de algunas de estas especies vectoras, para la construcción de mapas de riesgo que nos permitan enfocar posibles medidas de control de la leishmaniosis a partir de las características epidemiológicas de su vector.

La captura de flebótomos se ha realizado mediante trampas adhesivas colocadas durante 4 días en los lugares de reposo de estos dípteros, o mediante trampas de luz tipo CDC. Los ejemplares capturados se han montado entre

portaobjetos y cubreobjetos y se han clasificado morfológicamente para determinar la especie a la que pertenecen. A su vez se han recogido de cada uno de los puntos de muestreo información ecológica, geográfica y climática para su posterior análisis. Hemos observado que, utilizando como método de captura las trampas adhesivas, la especie más frecuente en el sur de la provincia de Granada es *S. minuta*, seguida de *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, *P. ariasi* y *P. alexandri*. En la provincia de Granada, *P. perniciosus* es el principal vector de *L. infantum* debido a que tiene una mayor densidad, abundancia y distribución que *P. ariasi*.

Teniendo en cuenta que la capacidad vectorial de una especie de flebotomo pudiera depender de la existencia de razas o incluso especies hermanas, que sólo pueden ser identificadas por métodos moleculares, se ha estudiado la variación genética de las poblaciones españolas de *P. sergenti* y *P. ariasi* comparándolas con ejemplares capturados en otras zonas endémicas. Para ello hemos escogido dos genes con una alta tasa de mutación que muestran un tipo de herencia diferente: el ITS2 del ADN ribosómico y el Cyt b del ADN mitocondrial. Para realizar este análisis se han seleccionado individuos de *P. sergenti* de varias localidades españolas y marroquíes capturados mediante trampas de luz tipo CDC; y de Marruecos, Argelia, España, Portugal y Francia en el caso de *P. ariasi*. A estos ejemplares se les ha extraído el ADN para posteriormente realizar una PCR-secuenciación de los genes antes mencionados. Las secuencias obtenidas se han analizado y utilizado para el estudio filogenético de las mismas. En el desarrollo de estos estudios hemos podido comprobar que las poblaciones de vectores de *L. tropica* y *L. infantum* presentan una gran diversidad, que es coincidente en su mayor parte con las teorías de dispersión propuestas para todos ellos. A su vez hemos determinado la existencia en *P. sergenti* de una línea mitocondrial común entre España y Marruecos.

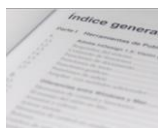
El uso de los Sistemas de Información Geográfica (SIG) permite la unión de datos epidemiológicos y medioambientales para la realización de análisis estadísticos espaciales y mapas (Mapping and Spatial Modeling Approaches) como muestran

algunos estudios realizados sobre diversas enfermedades de transmisión vectorial. Aplicando esta metodología, se han construido mapas de riesgo de exposición a *P. perniciosus* de la provincia de Granada que pudieran ser utilizados en programas de control de *L. infantum*, y mapas de riesgo de exposición a *P. sergenti* del suroeste europeo para la evaluación del posible establecimiento de un foco autóctono de *L. tropica* en esta región. La alta probabilidad de presencia observado en los mapas de riesgo de *P. sergenti* unido a la existencia de una línea mitocondrial coincidente entre España y Marruecos hace que el sur de la Península Ibérica deba considerarse una zona susceptible de sufrir el establecimiento de *L. tropica*. También hemos podido constatar que mediante el uso de muros de contención del terreno que posean tubos de PVC en sus agujeros de drenaje y que estén provistos de vegetación, se favorece una reducción significativa de la presencia de flebotomos vectores por lo que se muestran como unas factibles medidas de control de la enfermedad.

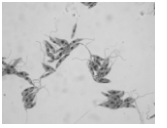
La realización de la presente tesis nos ha aportado un mejor conocimiento ecológico y/o genético de las principales especies vectoras presentes en España, proporcionándonos la información necesaria para poder realizar programas de control sobre la leishmaniosis más eficientes.



<u>Índice</u>		<u>Páginas</u>
1. INTRODUCCIÓN		1
1.1. Encuadre taxonómico de <i>Leishmania spp.</i>		3
1.2. Origen del género <i>Leishmania</i> e historia de la leishmaniosis		6
1.3. Aspectos generales de la leishmaniosis		13
1.3.1. Distribución mundial y número de casos anuales		14
1.3.2. El caso particular de España		16
1.3.3. Ciclo de vida general		18
1.4. Patología de la leishmaniosis		23
1.4.1. Leishmaniosis visceral		24
1.4.2. Leishmaniosis cutánea		26
1.4.3. Leishmaniosis cutánea post kala-azar		29
1.4.4. Leishmaniosis cutánea difusa		30
1.4.5. Leishmaniosis cutánea diseminada		32
1.4.6. Leishmaniosis cutáneo-mucosa		33
1.4.7. Coinfección HIV-Leishmania		35
1.5. Diagnóstico de la leishmaniosis		36
1.5.1. Diagnóstico mediante sintomatología		37
1.5.2. Diagnóstico parasitológico clásico		38
1.5.3. Diagnóstico inmunológico		40
1.5.4. Diagnóstico molecular		44
1.6. Tratamiento de la leishmaniosis		45
1.6.1. Tratamiento farmacológico		46
1.6.2. Tratamiento físico		49
1.7. Vectores		50
1.7.1. Taxonomía de los flebotomos		52
1.7.2. Morfología general		54
1.7.2.1. Cabeza		55
1.7.2.2. Tórax		60
1.7.2.3. Abdomen		62
1.7.3. Ciclo de vida y biología		65
1.7.4. Correspondencia <i>Phlebotomus-Leishmania</i>		71
1.7.5. Biología del parásito en el vector		74
1.7.6. Control del vector		76
1.7.7. Principales especies presentes en España		81
1.7.7.1. Distribución de las especies españolas		81
1.7.7.2. Características morfológicas principales de las especies españolas		83
1.8. <i>Leishmania infantum</i>		92
1.8.1. Encuadre taxonómico de <i>L. infantum</i>		92
1.8.2. Distribución de <i>L. infantum</i>		92
1.8.2.1. Distribución Mundial		92
1.8.2.2. Distribución en España		94
1.8.3. Patología de <i>L. infantum</i>		95
1.8.3.1. Leishmaniosis visceral producida por <i>L. infantum</i>		95
1.8.3.2. Leishmaniosis cutánea producida por <i>L. infantum</i>		97

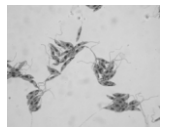


1.8.4.	Ciclo de vida de <i>L. infantum</i>	99
1.8.5.	Reservorios de <i>L. infantum</i>	100
1.8.6.	Vectores de <i>L. infantum</i>	101
1.9.	<i>Leishmania tropica</i>	102
1.9.1.	Encuadre taxonómico de <i>L. tropica</i>	102
1.9.2.	Distribución de <i>L. tropica</i>	103
1.9.2.1.	Distribución mundial	103
1.9.3.	Patología de <i>L. tropica</i>	104
1.9.3.1.	Leishmaniosis cutánea producida por <i>L. tropica</i>	105
1.9.4.	Ciclo de vida de <i>L. tropica</i>	106
1.9.5.	Reservorios de <i>L. tropica</i>	108
1.9.6.	Vectores de <i>L. tropica</i>	109
1.10.	Aplicación de los Sistemas de Información Geográfica en Epidemiología	110
1.10.1.	Aspectos generales de los Sistemas de Información Geográfica(SIG)	111
1.10.2.	Beneficios de la aplicación de los SIG	113
1.10.3.	Inconvenientes de la aplicación de los SIG	115
1.11.	Cambio climático y variables medioambientales	117
1.11.1.	Cambio climático	118
1.11.2.	Variables medioambientales usadas en Epidemiología	121
1.11.2.1.	Variables medioambientales recogidas mediante SIG	122
1.11.2.2.	Variables medioambientales recogidas en el campo	124
1.12.	Estudios moleculares intraespecíficos	126
1.12.1.	Uso de filogenia en los estudios moleculares intraespecíficos	127
1.12.1.1.	Métodos basados en distancia	130
1.12.1.2.	Métodos basados en caracteres discretos	131
2.	OBJETIVOS	135
3.	ARTÍCULOS (MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS)	139
3.1.	<u>Artículo 1:</u> Variabilidad intraespecífica (ITS de ADNr y Cyt B de ADNm) de <i>Phlebotomus sergenti</i> en España y Marruecos.	141
3.2.	<u>Artículo 2:</u> Estructura genética de poblaciones de <i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i> , vector de <i>Leishmania infantum</i> en el oeste mediterráneo: implicaciones epidemiológicas.	153
3.3.	<u>Artículo 3:</u> Mapas de riesgo para la presencia y ausencia de <i>Phlebotomus perniciosus</i> en un área endémica de leishmaniosis en el sur de España: implicaciones para el control de la enfermedad.	167
3.4.	<u>Artículo 4:</u> Riesgo de exposición a <i>Phlebotomus sergenti</i> (Parrot, 1917), y su relación con el posible establecimiento de un foco autóctono de <i>Leishmania tropica</i> en el suroeste de Europa.	181
4.	DISCUSIÓN GENERAL	193
5.	CONCLUSIONES	215
6.	BIBLIOGRAFIA	221
7.	ANEXO	267



1- INTRODUCCIÓN





1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es el nombre genérico que engloba a un grupo de enfermedades parasitarias que afectan al hombre y a otros mamíferos, y que están producidas por protozoos flagelados Trypanosomátidos del género *Leishmania* Ross, 1903 (Gállego, 2004; WHO, 2004). La transmisión natural de estas enfermedades suele ser zoonótica o antroponótica y se produce normalmente mediante la picadura de dípteros nematóceros de la familia *Phlebotomidae*, generalmente del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. En la actualidad se conocen cerca de 30 especies patógenas del género *Leishmania*, de las que unas 20 son capaces de producir la enfermedad en humanos, siendo en su mayoría zoonosis. Básicamente existen 3 formas clínicas: leishmaniosis cutánea, cutáneo-mucosa y visceral. Que se desarrolle una u otra depende de la especie del parásito y del estado inmunitario del hospedador. Por este motivo es importante identificar la especie.

1.1. Encuadre taxonómico de *Leishmania* spp

Son varias las clasificaciones que se han utilizado para encuadrar taxonómicamente al género *Leishmania*. Desde 1916 hasta 1987 se propusieron clasificaciones monotéticas (sólo usan un criterio diferenciador) que seguían el sistema de Linneo, y que se basaban principalmente en características eco-epidemiológicas y clínicas, y aspectos de comportamiento del parásito. En 1987, Lainson y Shaw publicaron una versión mejorada de la clasificación del género *Leishmania* pero no respondía al origen mono o polifilético del mismo. En esta clasificación, se establecían 2 subgéneros: *Leishmania*, que se encuentra presente tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo, y *Viannia* que se encuentra restringido al Nuevo Mundo. Estos dos subgéneros se diferenciaron inicialmente en función del lugar de multiplicación dentro del vector, ya que el subgénero *Leishmania* presenta



un desarrollo suprapilórico, mientras que el subgénero *Viannia* es peripilórico. Tradicionalmente, el género *Leishmania* se ha incluido dentro del Orden *Kinetoplastida*, debido a la presencia de una gran mitocondria única que ocupa gran parte del citoplasma, típica de los protozoos pertenecientes a este orden, dentro de la cual se puede observar el ADN mitocondrial enrollado llamado kinetoplasto o ADNk (Gállego Berenguer, 2006). La introducción en los estudios taxonómicos de técnicas bioquímicas y moleculares de análisis de diferentes marcadores, han logrado establecer relaciones filogenéticas entre los distintos grupos y especies. Estos estudios bioquímicos y moleculares se han basado principalmente en técnicas isoenzimáticas y de análisis del ADNk, y han permitido aceptar la clasificación propuesta por Lainson y Shaw (1987), en la que se establecen los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (Bañuls et al., 2007; Schönian et al., 2010). La posición taxonómica de las especies presentes en el hombre, propuesta por la WHO en 2010, se muestra a continuación.

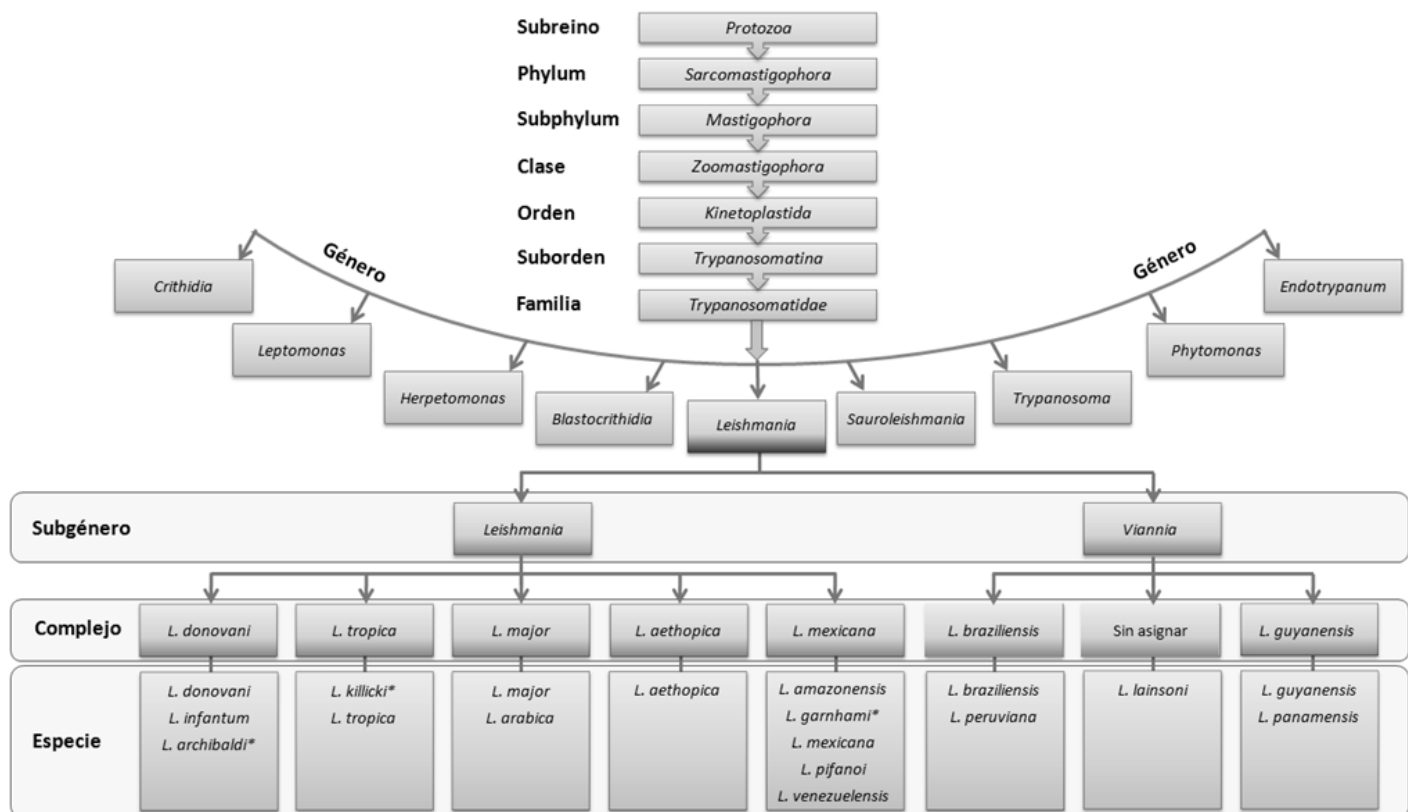
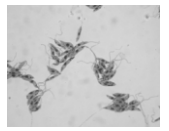


Figura 1. Clasificación taxonómica de las especies de *Leishmania* presentes en el hombre. *Especies cuya posición o existencia actual está bajo discusión. Obtenida de WHO (2010). Modificada por el autor.



Cabe destacar que en la Figura 1 se puede observar que dentro del complejo *L. donovani* no se incluye la especie *L. chagasi*, ya que se ha demostrado que es idéntica a *L. infantum*. Según Mauricio et al. (2000), *L. infantum* se introdujo en el Nuevo Mundo después de la colonización europea de las Américas y una vez allí se produjo una rápida colonización, poniéndole el nombre de *L. chagasi* al ser aislada por primera vez en este nuevo ambiente. Los datos genéticos y enzimáticos presentes sobre estas especies unidas al hecho de que no hay evidencias de peso que demuestren una presencia anterior de *L. chagasi* en las Américas, indican que ambas especies han de ser consideradas sinónimas. Además de las especies mostradas en la Figura 1, hay otras no descritas que actualmente están siendo objeto de estudio, algunas de las cuales son capaces de producir patologías en el hombre (Ashford, 2000; WHO, 2010). Otra especie sometida a controversia ha sido *L. archibaldi*, descrita en Sudán. Algunos autores han dudado de su existencia, otros la han considerado sinónima de *L. donovani*, y otros intermedia entre *L. donovani* y *L. infantum*. Pratlong et al. (2013) mantienen su estatus específico.

También cabe mencionar que hay una serie de especies que no producen enfermedad en el hombre tanto en el Viejo Mundo (*L. arabica* y *L. gerbilli* del complejo *L. major*) como en el Nuevo Mundo (*L. aristidesi*, *L. enrietti*, *L. deanei* y *L. hertigi*), y que estarían incluidas dentro del subgénero *Leishmania*. La descripción reciente de *L. siamensis* en Tailandia y EEUU (Bualert et al., 2012; Reuss et al., 2012), y su similitud con *L. enrietti*, habla de la importancia que pueden tener estas especies. A pesar de que la clasificación mostrada en la Figura 1 es la más aceptada actualmente por la OMS, diversos autores han propuesto actualizaciones en esta clasificación. Según esta nueva tendencia el género *Leishmania* estaría encuadrado taxonómicamente en el Reino *Protozoa*, Phylum *Euglenozoa*, Clase *Kinetoplastea* (Cavalier-Smith, 1998; Cox, 2002; de-Meeûs y Renaud, 2002), mientras que Adl et al. (2005) consideran que el Phylum *Euglenozoa* quedaría dentro del super-grupo *Excavata*.

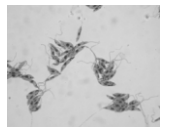


1.2. Origen del género *Leishmania* e historia de la Leishmaniosis

Aunque el origen del género *Leishmania* ofrece una gran controversia, en la actualidad hay dos tendencias principales, el origen Paleártico y el Neotropical. La primera teoría sugiere que el género *Sauroleishmania* se originó en reptiles del Cretácico en el Paleártico, adaptándose posteriormente a roedores, evolucionando conjuntamente con ellos y apareciendo el género *Leishmania*. Posteriormente el subgénero *Leishmania* se expandió por la región Neártica a través del Puente de Bering al final del Eoceno. Después se dispersó posiblemente por el Puente de Panamá a la región Neotropical, donde se originó el subgénero *Viannia* por una rápida especiación a partir del subgénero *Leishmania*, favorecida por las particulares características medioambientales de esta región (Kerr, 2000; Kerr et al., 2000).

La segunda teoría sugirió que el género *Leishmania* divergió del género *Endotrypanum* en la región Neotropical durante el Paleoceno, siendo sus primeros reservorios vertebrados las especies del género *Xenarthra* (perezosos). Posteriormente migró al Paleártico a través del Puente de Bering, hace 15 millones de años durante el Mioceno tardío, antes de que esta región fuera demasiado fría para el paso de sus vectores (Noyes, 1998; Noyes et al., 2000). Antes de esta migración, divergió el subgénero *Viannia* durante el Mioceno temprano, y posiblemente ya en el Viejo Mundo se produjo la divergencia de los subgéneros *Leishmania* y *Sauroleishmania* como consecuencia de su adaptación a los reptiles durante la segunda mitad del Mioceno, aunque también se piensa que pudieron divergir en el Nuevo Mundo y migrar de forma independiente al Viejo Mundo.

Igualmente se ha sugerido, teniendo en cuenta las teorías anteriores, otra posible explicación para el origen del género *Leishmania* y la formación de los distintos subgéneros (Momen y Cupolillo, 2000). Según esta teoría, posiblemente los subgéneros *Sauroleishmania* y *Leishmania* divergieron a partir de un ancestro común en el Paleártico mediante la adaptación a sus distintos reservorios. Posteriormente el



subgénero *Leishmania* se dispersó al Neártico con sus hospedadores roedores por el Puente de Bering durante el Eoceno, pudiendo entrar después al Neotrópico a través de sucesivos saltos por las islas que los separaban o después de la formación del Puente de Panamá durante el Plioceno. Según estos autores, el grupo *Euleishmania* evolucionó de forma separada originando el subgénero *Leishmania* en el Viejo Mundo y el subgénero *Viannia* en el Nuevo Mundo a partir de un ancestro común después de la separación de Gondwana en el Mesozoico. Por el contrario, el grupo *Paraleishmania* se pudo originar mediante la adaptación del género *Leishmania* a los roedores *Histricomorfos* (puercoesquinos) después de su introducción en el Neotrópico durante el Cenozoico temprano, ya que estos roedores no se han encontrado parasitados por ninguna otra especie de *Leishmania*. A partir de esta primera *Paraleishmania* pudieron surgir el resto de especies que conforman este grupo a través de su evolución y adaptación a distintos hospedadores.

Independientemente del origen y diseminación de este género, desde la antigüedad se han venido recogiendo descripciones de dolencias que se asemejan a la leishmaniosis, tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. Las primeras referencias que se dan de esta enfermedad, se recogen en el “Papiro de Ebers” donde se cita como “grano del Nilo” (Leishmaniosis cutánea) (García-Almagro, 2005). Este documento fue redactado en el antiguo Egipto cerca del año 1600 a. C. y se trata de uno de los más antiguos tratados de medicina que se conocen. Zink et al. (2006) encontraron leishmaniosis visceral en tumbas egipcias del año 2000 a. C. También hay referencias en la Biblia mediante la sexta plaga de Egipto (Éxodo 9:8) y en la promulgación de la ley de Dios por Moisés, como una de las maldiciones de Yahvé a los desobedientes a sus mandamientos (Deuteronomio 28:27) (García-Almagro, 2005). También en el Levítico, 13: 4-8 se diferencia entre las erupciones y la lepra. A su vez, en tablillas originarias de la biblioteca de Nínive, creada por el rey Asirio Ashurbanipal (siglo VII a. C.), se descubrieron descripciones de lesiones similares a leishmaniosis cutáneas, algunas de las cuales pueden haber derivado de textos

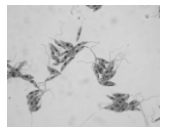


incluso anteriores al 1500-2500 a. C. (ul Bari, 2006). En el siglo X algunos médicos musulmanes, como por ejemplo Avicena, describieron detalladamente lo que se llamó “Balkh doloroso” (ul Bari, 2006). También hay referencias de leishmaniosis cutáneo-mucosas en el Nuevo Mundo durante la época precolombina, resultado del estudio de los “huacos”, figuras de arcilla realizadas por los Incas peruanos en las que se pudieron observar que algunas representaciones presentaban lesiones cutáneas y deformidades de la cara. Los españoles que penetraron en los valles andinos tras la conquista de Perú, desarrollaron lesiones mutilantes semejantes a las representadas en los “huacos” (Oumeish, 1999). En 1688, Diego López Cogolludo relató que los primeros franciscanos que intentaron convertir a los indígenas americanos se encontraron que un gran número de éstos presentaban las “orejas podridas”, y en 1927 se publicó el hallazgo de idolillos de piedra con las “orejas comidas”, mutilaciones que parecían hechas *ex profeso* y no por acción del paso del tiempo (Rebollar, 1995). En este sentido cabe resaltar que recientemente se han encontrado 4 calaveras de mujer en el cementerio arqueológico de Cayo Oriente (Chile) con lesiones propias de leishmaniosis cutáneo-mucosa crónica que fueron confirmadas por PCR (Costa et al., 2009). El ADN aislado era distinto a *L. donovani*.



Figura 2. Huacos Mochicas (A y C) y caso real (B) mostrando lesiones típicas de leishmaniosis. Imágenes obtenidas de la página web de la WHO y del Dr. Zuño Burstein (UNMSM, Lima (Perú)).

A finales del siglo XIX y principios del siglo XX Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wrigth, Lidenberg y Vianna, identificaron cada uno de forma independiente al agente causante de las leishmaniosis, al que Roland Ross dio el



nombre genérico de *Leishmania* (WHO, 2010). En 1756, Alexander Russell hizo una descripción detallada de la enfermedad después de examinar a un paciente turco en Aleppo. En 1885 Cunningham identificó a los parásitos causantes de la leishmaniosis cutánea, y en 1898 Peter Borovsky publicó la primera descripción exacta del agente causal distinguiendo núcleo y kinetoplasto en los amastigotes, así como la relación del parásito con los tejidos del hospedador, y que se trataba de un protozoo. Esta última publicación se realizó en una revista rusa de baja difusión por lo que no tuvo repercusión internacional hasta pasados varios años. En 1903 Leishman y Donovan describieron al protozoo causante del Kala-Azar en la India, mientras que Wright, en ese mismo año, lo describió a partir de la úlcera de un niño armenio (*L. tropica*). Finalmente Ronald Ross, también en 1903, estableció la relación entre la enfermedad y el parásito, y llamó al organismo *Leishmania donovani*. En 1904, Cathoire y Laveran encontraron en Italia *Leishmania* en un niño con anemia esplénica infantil; y Nicolle (1908) en Túnez cultivó por primera vez al parásito en el laboratorio en medio agar sangre ó medio NNN, identificó al perro como reservorio, y lo llamó *Leishmania infantum*.

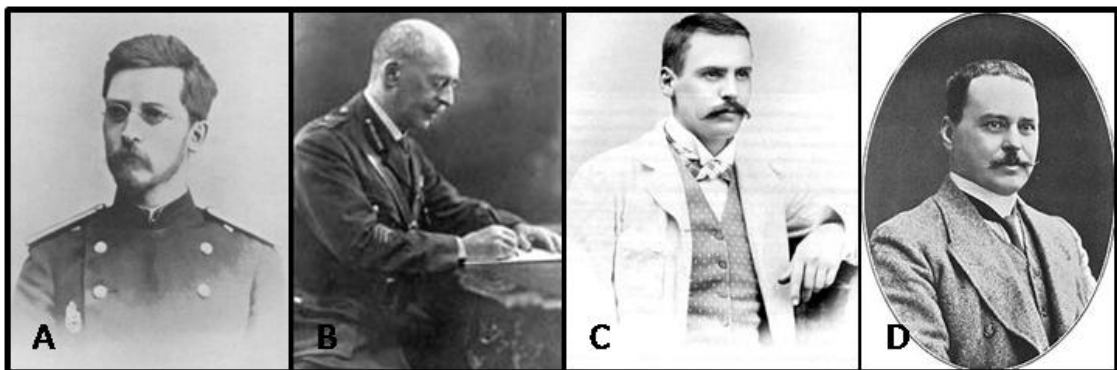


Figura 3. Retratos de algunos de los principales investigadores responsables del descubrimiento de la leishmaniosis: (A) Peter Borovsky (1863-1932), (B) William Boog Leishman (1865-1926), (C) Charles Donovan (1863-1951), (D) Ronald Ross (1857-1932). Las imágenes se han obtenido en Wikipedia (A, B y D), y la imagen C de <http://www.nodo50.org/amigosdelosgalgos/leishmania.html>.

En el Nuevo mundo los primeros datos de la enfermedad fueron publicados por Lindenberg en 1909 mediante el estudio de una lesión cutánea en el distrito de Sao Paulo en Brasil, mientras que Vianna en 1911 clasificó al parásito como



Leishmania braziliensis. En 1912 este mismo autor demostró la utilidad del uso de antimoniales (tártaro emético) en el tratamiento de la enfermedad cutánea, mientras que en 1915, Di Cristina y Caronia, demostraron esta utilidad frente a la leishmaniosis visceral en Italia.

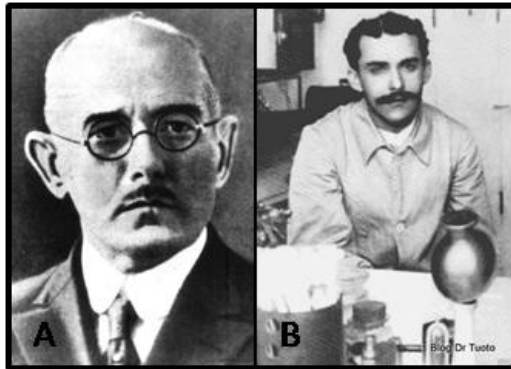
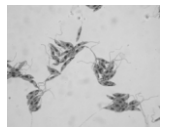


Figura 4. Retratos de algunos de los principales investigadores responsables del descubrimiento de la leishmaniosis en sudamérica: (A) Adolpho Lindenberg (1872-1944), (B) Gaspar Vianna (1885-1914). Imágenes obtenidas de Lainson, 2010.

En 1911 Wenyon sugirió que un hematófago podría ser el vector de la leishmaniosis, pero no fue hasta 1921 cuando ésto fue confirmado por los hermanos Sergent, Parrot, Donatien y Bequet mediante el desarrollo de lesiones cutáneas en voluntarios a los cuales se les inoculó experimentalmente un triturado de hembras de flebotomo. Poco después, en 1925, Adler y Theodor demostraron la transmisión experimental de la leishmaniosis cutánea a través de la picadura de *Phlebotomus papatasi*. En 1912 Carini identificó *Leishmania* en lesiones de mucosas en pacientes de Brasil, en 1913 Bates describió el primer caso de leishmaniosis en mucosa nasal, y en 1914 los rusos Yakimoff y Shakor distinguieron los parásitos que causaban la leishmaniosis cutánea en Asia central, describiendo *L. major*.

En 1922 Bramachari introdujo el primero de los varios antimoniales pentavalentes que se han utilizado para el tratamiento de la leishmaniosis. Montenegro en 1926 empleó por primera vez la intradermorreacción (IDR) de antígenos de *Leishmania* como método de diagnóstico de la leishmaniosis cutáneo-mucosa (Test de Montenegro), mediante la inoculación intradérmica de una suspensión de organismos muertos obtenidos de cultivo. Posteriormente este test se



ha usado en multitud de estudios epidemiológicos tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. En 1942 Vilanova realizó por primera vez un tratamiento intralesional de la leishmaniosis con antimonio pentavalente.

En 1948 tanto Prado Barrientos en Brasil como Convit y Kerdel-Vegas en Venezuela, publicaron los primeros casos de leishmaniosis cutánea diseminada (Corrales Padilla y Lainez, 1968). En 1968, Gunders et al., establecieron el carácter zoonótico de la leishmaniosis al encontrar *Leishmania major* en el roedor *Psammomys obesus*. En 1985, De la Loma et al., describieron por primera vez la coinfección de *Leishmania* con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), y en 1996 se citó el ciclo artificial antroponótico en estos coinfectados a través de las jeringuillas (Alvar et al., 1997), cuya existencia fue apoyada por otras investigaciones (Pineda et al., 2001; Morillas-Márquez et al., 2002).

En los años 70 en Kenia y en los años 80 en la India se empezaron a ver los primeros casos de resistencia a los antimoniales pentavalentes, por lo que en la búsqueda de nuevos fármacos se registró en 1996 el primer uso de la anfotericina B liposomal como tratamiento de la leishmaniosis, de la miltefosina en 2004 y de la paromomicina en el 2006.

En el caso concreto de España, el primer caso de kala-azar lo describió Pittaluga en 1912 mediante la visualización del parásito en una muestra obtenida a partir de una punción esplénica, en la comarca de Tortosa. El primer caso de leishmaniosis canina lo describió también Pittaluga en esta misma región un año más tarde. Poco después, en 1914, Camacho Alexandre y Fernández Martínez describieron de forma casi simultánea los primeros casos de botón de oriente en la costa oriental de Andalucía. Posteriormente se comprobó que tanto Kala-Azar como botón de oriente se trataban de dolencias relativamente frecuentes que afectaban a amplias zonas del país. A partir de 1920 se incrementó el número de casos diagnosticados de kala-azar debido a las campañas antipalúdicas que se realizaron en



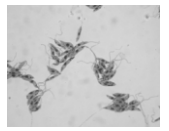
zonas rurales. En 1925 Pittaluga ya mencionaba la presencia de 343 casos de kala-azar confirmados por punción esplénica, mientras que en 1932 Benavente García cifraba en un millar los casos producidos y Najera en 1947 en dos millares. En los años 40 se produjo un aumento sustancial de las publicaciones sobre leishmaniosis posiblemente debido al incremento del interés por esta enfermedad. La primera cita de la utilización del Test de Montenegro en España la realizó Vilanova en 1954.



Figura 5. Retrato de Gustavo Pittaluga Fattorini (1876-1956). Imagen obtenida de la Real Academia Nacional de Medicina, España.

En cuanto al tratamiento de la enfermedad, en 1914 se introdujo el permanganato potásico como primera sustancia usada para el tratamiento tópico del botón de Oriente, que posteriormente fue sustituido por otras sustancias hasta la utilización de antimoniales pentavalentes por inyección intralesional (Botet y Portús, 1993). Cabe destacar que a principios del 2012 los laboratorios Virbac han comenzado a comercializar la primera vacuna contra la leishmaniosis canina con el nombre de CaniLeish. A pesar de que según estos laboratorios la eficacia es bastante alta, se ha podido comprobar que en algunos casos se producen efectos secundarios aunque no revisten especial gravedad. A su vez, a mediados de 2012 los laboratorios Esteve han comercializado el Leisguard, un jarabe activador del sistema inmune del perro cuyo principio activo es la domperidona (Gómez-Ochoa et al., 2009; Gómez-Ochoa et al., 2012).

En lo referente a la presencia en España de flebotomos, en 1909 Czerny y Strobl identificaron la especie *Phlebotomus papatasi* a partir de las capturas de Lauffer en El Escorial (Madrid), siendo ésta la primera cita de flebotomos en la



Península Ibérica. Sin embargo, León-Sanz et al. en 1998 pudieron analizar las muestras obtenidas por Lauffer, depositadas en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC, Madrid), observando que se había producido un error en la clasificación de estos ejemplares, por lo que realmente las primeras especies capturadas en la Península Ibérica fueron *Phlebotomus ariasi* y *Phlebotomus perniciosus*. La primera captura de *Phlebotomus papatasi* en España la realizaron Pittaluga y De Buen en 1917. En 1923 Pittaluga señala la presencia en España de 4 especies de flebotomos: *P. papatasi*, *P. minutus* (actualmente *Sergentomyia minuta*), *P. legeri* (actualmente *P. perniciosus*) y *P. sergenti*. En 1921, Tonnoir describe *P. ariasi* a partir de ejemplares capturados en Barcelona. Posteriormente varios autores se dedicaron al estudio de estos dípteros hasta que Gil Collado et al. (1989) realizaron una revisión en la que se incluían todas las especies presentes en España, así como su distribución, taxonomía, y biología. En 1992, Gállego-Berenguer et al., realizaron una revisión de esta distribución añadiendo nuevos datos de ocupación de especies en provincias en las que anteriormente no estaban presentes. A partir de entonces hasta la actualidad hay multitud de estudios realizados sobre estos dípteros. En España, actualmente se han identificado un total de 11 especies de flebotomo (Gállego-Berenguer et al., 1992; Lucientes et al., 1994; Martínez-Ortega et al., 1996).

1.3. Aspectos generales de la leishmaniosis

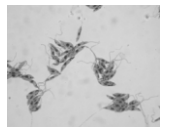
La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria relacionada principalmente con zonas deprimidas económicamente o en países en vías de desarrollo, que se localizan en zonas de clima cálido o templado. Las infecciones producidas por *Leishmania* se producen por todo el mundo, estando involucradas distintas especies que son responsables de un amplio espectro de enfermedades clínicas en humanos. A pesar de ser una enfermedad con una alta incidencia a nivel mundial, en la actualidad la leishmaniosis sigue siendo una de las enfermedades más olvidadas por las instituciones sanitarias, ya que se considera que representa un problema de baja



prioridad. Esta consideración se debe principalmente a que normalmente suele aparecer en regiones rurales y periurbanas alejadas de los centros de gobierno, y a la distribución parcheada de las zonas de transmisión, a la vez que existen otros problemas de salud pública de mayor magnitud y repercusión mediática (Desjeux, 1996; Desjeux y Alvar, 2003; WHO, 2004). En la última década se han realizado importantes avances científicos en el tratamiento, diagnóstico y prevención de la leishmaniosis, a la vez que los precios de varios medicamentos esenciales se han reducido. Estas investigaciones han facilitado la implementación de programas de control nacionales y regionales sostenibles. Sin embargo, la mortalidad y morbilidad de la leishmaniosis en todo el mundo muestran una preocupante tendencia creciente debido a que el funcionamiento de estos programas de control sigue siendo escaso (WHO, 2010).

1.3.1. Distribución mundial y número de casos anuales

Las leishmaniosis están ampliamente extendidas, produciéndose la transmisión a humanos en 5 continentes, aunque la mayor parte de los casos se producen en unos pocos focos. Según la WHO la leishmaniosis es endémica en 98 países, alcanzándose una población de riesgo de 350 millones de personas (Figura 5). Se estima que la prevalencia está en torno a 12 millones de personas, y que la incidencia anual es de 2 millones de casos (1,5 millones de casos de leishmaniosis cutánea y 0,5 millones de casos de leishmaniosis visceral). Según Alvar et al. (2012), oficialmente se declaran anualmente más de 58.000 casos de leishmaniosis visceral y más de 220.000 casos de leishmaniosis cutánea, por lo que el número de casos declarados oficialmente es mucho menor al real. Además cada año se producen más de 50.000 muertes producidas por leishmaniosis visceral, mortalidad que solo es superada por la malaria y la ascariosis entre la enfermedades parasitarias (WHO, 2010). Del total de países que se ven afectados por esta enfermedad, solo en 40 se trata de una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO). Actualmente se acepta un



importante déficit en cuanto al número de casos declarados, siendo estas cifras uno de los mayores condicionantes para que se haya considerado a la leishmaniosis una enfermedad de baja prioridad (Gállego, 2004). A pesar de ser EDO, el número de casos declarados es muy inferior al real por lo que se está subestimando la incidencia de esta enfermedad.



Figura 6. Distribución mundial de los casos de leishmaniosis y coinfección VIH-*Leishmania* (1990-1998) (WHO, 2007).

En marzo de 2010 la coinfección HIV-*Leishmania* había sido mencionada en 35 países endémicos (Figura 5). Hay que destacar que la coinfección con el VIH ha intensificado el número de casos de leishmaniosis cutánea y visceral, a la vez que han producido formas severas más difíciles de manejar. En Europa el uso de las terapias antirretrovirales ha reducido este incremento en el número de casos, pero en regiones en las que el acceso a estas terapias está más restringido la prevalencia muestra un crecimiento constante (López-Vélez, 2003; ter Horst et al., 2008).

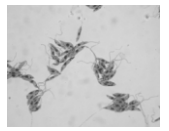
En los últimos años se han descrito casos autóctonos en áreas anteriormente no endémicas como son, entre otras, Estados Unidos y Canadá, donde se han



encontrado perros con anticuerpos anti-*Leishmania* (Enserink, 2000), en la zona norte de Australia donde se han encontrado canguros con leishmaniosis cutánea (Rose et al., 2004), y en Alemania donde se han diagnosticado diversos casos humanos, caninos y equinos (Bogdan et al., 2001; Koehler et al., 2002). Por lo tanto la leishmaniosis se trata de una enfermedad dinámica con unas circunstancias de transmisión en continuo cambio debido a factores ambientales, demográficos y de comportamiento humano (Gramiccia y Gradoni, 2005).

1.3.2. El caso particular de España

En la Península Ibérica, *Leishmania infantum* es la única especie responsable de la leishmaniosis humana, canina y de otros hospedadores tanto cutánea como visceral y cutáneo-mucosa (Martín-Sánchez et al., 1996; Martín-Sánchez et al., 2004). En España, la leishmaniosis ha sido considerada Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) desde 1982 (B.O.E. nº13, 1981) hasta 1996, año en el cual se creó la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y la enfermedad pasó a ser competencia de las Comunidades Autónomas con casos registrados (Real Decreto 2210/1995). Aunque la leishmaniosis dejó de ser una EDO a nivel estatal, en la comunidad andaluza sigue siendo de declaración obligatoria, por lo que las instituciones sanitarias han de declarar todos los casos detectados. Lamentablemente esto no se llega a cumplir totalmente ya que las cifras declaradas a nivel provincial y autonómico quedan infravaloradas por el hecho de que fundamentalmente se declaran los casos viscerales, debido a que en muchas ocasiones las leishmaniosis cutáneas son confundidas con otras afecciones de la piel, o simplemente no son declaradas. Como ejemplo cabe indicar que en el periodo comprendido entre 1984-1986 en la provincia de Granada se declararon tan solo 6 casos de leishmaniosis en los distintos Boletines Epidemiológicos consultados, mientras que en ese periodo al menos se diagnosticaron 12 casos de leishmaniosis cutánea en esta provincia (Alcalde-Alonso et al., 1989).



Por otro lado tenemos la falta de declaración de los casos de infección críptica, cuando aproximadamente el 60% de las co-infecciones *Leishmania*-VIH son asintomáticas (Pineda et al., 1998). En un estudio realizado sobre población asintomática, inmunocompetente, sin antecedentes de leishmaniosis y con riesgo de infección parenteral, se observó que el 8% de los individuos presentan títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* $\geq 1:80$, y que en el 24% de las personas que presentan títulos $\geq 1:20$ (seropositivos) se detectó ADNk de *Leishmania infantum* en sangre (Martin-Sánchez et al., 2004). Por lo tanto, los datos presentados en los Boletines Epidemiológicos no son más que el pico del iceberg, siendo los casos reales de infección por *Leishmania* superiores a los presentados en estas publicaciones. A este respecto, Valcarcel et al. (2008) obtuvieron en un estudio retrospectivo sobre altas hospitalarias en el periodo 1999-2003, tasas de leishmaniosis de 0,4 (casos/100.000 hab. por año), similar a las obtenidas por Gil-Prieto et al. (2011). Cabe destacar que algunos estudios mencionan la ausencia de casos de leishmaniosis cutánea en España, seguramente debido a que no requieren ingreso hospitalario y no son notificados (Dujardin et al., 2008; Alvar et al., 2012). Contradiendo este hecho, Alcalde-Alonso et al. (1989) mencionan la presencia de 41 casos de leishmaniosis cutánea entre 1981-1986 sólo en la provincia de Granada, mientras que García-Almagro (2005) recoge 131 casos cutáneos y mucosos en Toledo entre los años 1992-2004, y Aguado et al. (2013) recogieron un total de 149 casos cutáneos en un brote de leishmaniosis en Fuenlabrada (Madrid) entre los años 2010-2012. A pesar de estos datos de infección de humanos en España, no se considera que el hombre actúe como hospedador reservorio de *L. infantum*.

Aunque se han descrito casos de infección en zorros (Fisa et al., 1999), ratas (Morillas-Márquez et al., 1985), équidos (Solano-Gallego et al., 2003), gatos (Martín-Sánchez et al., 2007) y otros animales salvajes (Sobrino et al., 2008), el papel de reservorio lo desempeña fundamentalmente el perro doméstico (*Canis familiaris*) (Acedo-Sanchez et al., 1996; Alvar et al., 2004), siendo por lo tanto el principal animal

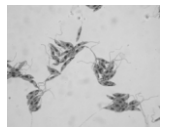


implicado en el mantenimiento y distribución de *L. infantum*, y cuya relación con la enfermedad ha sido estudiada durante años (Alvar et al., 2004). Dentro de estos animales que han sido encontrados infectados, han despertado un interés especial los casos de leishmaniosis felina en el ciclo urbano de la enfermedad, y el zorro y la liebre en el ciclo silvestre (Fisa et al., 1999; Portus et al., 2002; Martin-Sanchez et al., 2007; Molina et al., 2012).

Las cifras de leishmaniosis canina obtenidas tanto en toda la Cuenca Mediterránea como particularmente en España, donde se han registrado prevalencias del 0 al 100% (Acedo-Sánchez et al., 1996; Morillas et al., 1996; Fisa et al., 1999; Lepe et al., 2000; Solano-Gallego et al., 2001; Lucientes et al., 2005; Miró et al., 2007; Gálvez et al., 2010b; Chitimia et al., 2011), indican que nos encontramos ante una enfermedad de gran impacto en términos de sanidad animal (Gállego, 2004; Urbano et al., 2009). Además, al igual que ocurre con la variante humana de la enfermedad, un elevado porcentaje de estos animales infectados no llegan a ser identificados ni declarados. Esta subestimación en el número de casos puede estar relacionada con el hecho de que en torno al 50% de los perros infectados presentan la enfermedad de forma asintomática durante largos periodos (Cabral et al., 1992; Solano-Gallego et al., 2001; Moreno y Alvar, 2002), o con el hecho de que muchos de los síntomas causados por esta enfermedad son similares a los causados por otras patologías (Alvar et al., 2004). También cobra importancia en esta subestimación la falta de control de las poblaciones de perros vagabundos, que pueden suponer hasta un 22% de la población canina española (Moreno y Alvar, 2002), y cuya prevalencia de infección puede ser superior a la mostrada por los perros domésticos (Miró et al., 2007).

1.3.3. Ciclo de vida general

El ciclo de vida de las especies del género *Leishmania* presenta un hospedador vertebrado y otro invertebrado que actúa como vector del parásito (ciclo de vida



heteroxeno). Estos hospedadores invertebrados son dípteros nematóceros principalmente del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, mientras que el hospedador vertebrado incluye a varios grupos de animales entre los que se incluye el hombre. El ciclo de vida de estos protozoos, al tratarse de parásitos polimórficos, presenta una serie de formas que se diferencian principalmente por la presencia o ausencia parcial de flagelo y por la disposición del kinetoplasto y del núcleo dentro del citoplasma. Entre estas fases se distinguen principalmente: promastigote y amastigote (Figura 6), siendo el resto de formas estadios intermedios entre ambos que se producen en el interior del hospedador invertebrado. El promastigote es una forma extracelular, fusiforme y móvil, con un tamaño comprendido entre 10-30 μm de longitud y entre 1,5-3 μm de ancho, con un núcleo oval central, con un kinetonúcleo bastoniforme prenuclear (El kinetonúcleo es una estructura “visual” formada por el kinetoplasto y el cuerpo basal del flagelo), y con un flagelo anterior libre (Figura 6A) (Killick-Kendrick, 1990). El amastigote por el contrario es una forma endocelular presente principalmente en el citoplasma de los macrófagos del hospedador vertebrado, con una forma ovalada o redondeada, un tamaño de 3-5 μm de longitud y entre 1’5-2’5 μm de ancho, un núcleo esférico excéntrico, y un kinetonúcleo anterior (Figura 6B) (Lainson y Shaw, 1987; Alexander et al., 1999).

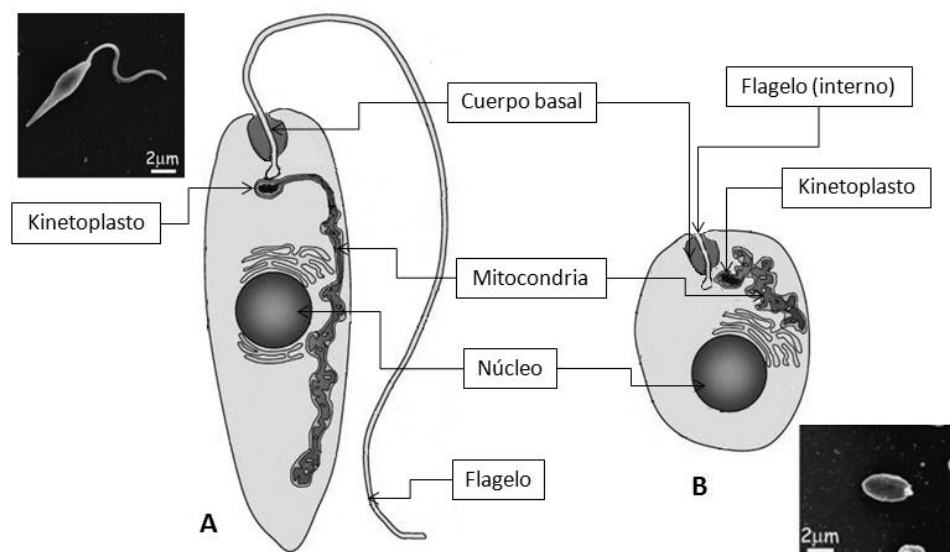


Figura 7. Estructura celular e imagen a microscopía electrónica de las principales formas de *Leishmania* spp.: (A) Promastigote, (B) Amastigote. Imágenes obtenidas de Besteiro et al. (2007). Modificadas por el autor.



En el hospedador invertebrado: La parte del ciclo biológico que ocurre dentro del vector se inicia cuando la hembra del flebotomo ingiere los macrófagos infectados con las formas amastigote de *Leishmania* junto con la sangre del hospedador vertebrado. Una vez en la luz del intestino medio del flebotomo, el protozoo sale del macrófago y se transforma en promastigote procíclico, dentro de las siguientes 24-48 horas, y se multiplica activamente mediante fisión binaria longitudinal.

En un momento dado estos promastigotes procíclicos atraviesan la membrana peritrófica que rodea a la sangre ingerida, y tras varios días se transforman en promastigotes nectomonas y migran hasta la válvula estomodeal, situada en la región anterior del intestino medio. Posteriormente van a sufrir una serie de transformaciones intermedias que van a dar lugar a las leptomonas y haptomonas. Después de pasar por estas fases intermedias, finalmente se van a transformar en promastigotes metacíclicos que son la fase infectiva para el hospedador vertebrado.

Esta última forma de promastigote se sitúa en la válvula estomodeal, e invade las partes orales del flebotomo, tales como las glándulas salivares, faringe y probóscide. Una vez que estas formas infectivas se sitúan en las estructuras del vector antes mencionadas, el parásito pasa al hospedador vertebrado a través de la picadura del flebotomo, inoculándole entre 10-100 promastigotes presentes en la probóscide, sin que se sepa con exactitud cómo el parásito sale en dirección contraria al flujo sanguíneo ingerido. La mayoría de las teorías formuladas en este sentido mencionan la obstaculización en la entrada de sangre por acumulación de parásitos y su posterior regurgitación de forma activa por el flebotomo para evitar el bloqueo de la alimentación, o el deterioro del sistema de alimentación del flebotomo (Schlein, 1993; Bates, 2007; Sánchez-Saldaña et al., 2004). Otro posible método de infección sería la transmisión de forma pasiva de los promastigotes metacíclicos que están situados en las piezas bucales de la probóscide que son introducidas en la piel.

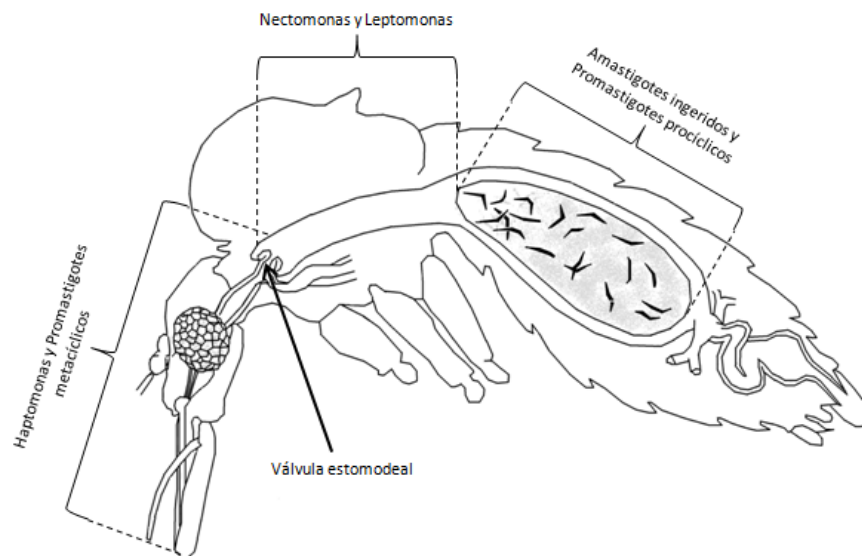
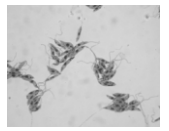


Figura 8. Transformaciones sufridas por *Leishmania* dentro del hospedador invertebrado. Tomada de Schlein (1993). Modificada por el autor.

En el hospedador vertebrado: Una vez que los promastigotes se han introducido en el interior del hospedador vertebrado, estos activan el complemento por una vía alternativa que favorece la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Además de esta activación del complemento, el trauma mecánico propio de la picadura también induce la llegada de neutrófilos a la zona. Los promastigotes metacíclicos van a permanecer en el espacio intercelular hasta que son fagocitados por macrófagos o por células dendríticas de la dermis, o son englobados por neutrófilos. En el primero de los casos, una vez que son fagocitados quedan englobados en vacuolas parasitóforas, donde gracias a una serie de mecanismos, son capaces de resistir a la actividad digestiva y antimicrobiana de estas células fagocíticas. A su vez, la saliva del flebotomo favorece la reducción en la producción de óxido nítrico en los macrófagos activados por lo que también tiene un rol en el establecimiento de la infección. En el interior de esta vacuola parasitófora, el parásito se transforma en la forma amastigote y se multiplica activamente por división binaria. El macrófago es capaz de albergar hasta 200 amastigotes, lo que provoca la distensión del macrófago hasta que éste estalla y los amastigotes son liberados al exterior.

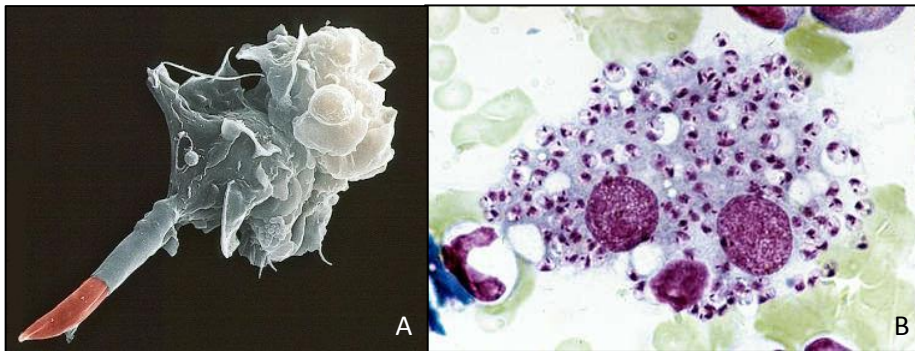


Figura 9. (A) Imagen a microscopia electrónica de un macrófago fagocitando a un promastigote de *Leishmania* (Obtenida de Sciencephotolibrary); (B) Frotis teñido con amastigotes de *Leishmania* dentro del citoplasma de macrófagos (Imagen obtenida de CVBD; Canine Vector-Borne Diseases-Bayer).

Aparte de este proceso, algunos autores hacen alusión a un proceso exocítico que implica la formación de pequeñas vacuolas que se fusionan a la superficie del macrófago y permiten que los amastigotes sean liberados al torrente sanguíneo (Rittig y Bogdan, 2000). Los amastigotes libres van a infectar otros macrófagos, o bien se diseminan a través del torrente circulatorio o vía linfática para infectar órganos ricos en estas células inmunes como son hígado, bazo o médula ósea. En el caso de que los promastigotes metacíclicos queden englobados en neutrófilos, éstos se dividen en su interior hasta que los neutrófilos son lisados. Para garantizar su supervivencia, estos promastigotes metacíclicos necesitan volver a ser fagocitados por otras células mieloides (Gállego-Berenger, 2006; Kaye y Scott, 2011; Sánchez-Saldaña et al., 2004).

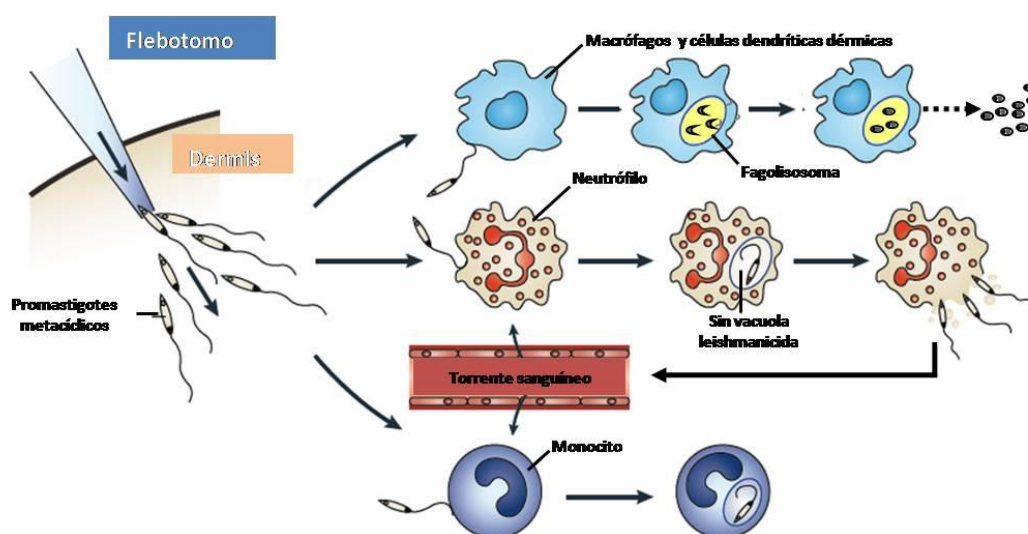
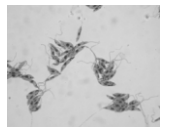


Figura 10. Líneas celulares implicadas en la interacción hospedador-parásito. Obtenida de Kaye y Schott (2011), y modificada por Morales-Yuste (2012).



Dado que los macrófagos son células especializadas en la destrucción de los patógenos invasores e iniciación de la respuesta inmune, como ya hemos comentado anteriormente, los parásitos del género *Leishmania* han desarrollado un complejo abanico de sofisticados mecanismos para evadir estas funciones. Entre los más conocidos podemos destacar la capacidad para inhibir la activación del óxido nítrico o ciertas citocinas relacionadas con el inicio de la respuesta inmune, las modificaciones en la estructura y composición de ciertas proteínas de superficie, y la incorporación de lípidos de membrana con función mimética procedentes de las células hospedadoras (Alexander et al., 1999; Olivier et al., 2005). El flebotomo cierra el ciclo al ingerir la sangre infectada.

1.4 Patología de la Leishmaniosis

Las diferentes especies del género *Leishmania* son capaces de producir varios tipos de leishmaniosis, y a su vez la patogenicidad de cada especie individual de *Leishmania* varía en las diferentes poblaciones humanas dependiendo de su respuesta inmune (por ejemplo que vivan en zona endémica o no), y de la cepa o especie de *Leishmania* infectante. Dependiendo del grado de esta respuesta inmune, la enfermedad presentará signos clínicos o subclínicos, a la vez que puede variar la tasa de curación espontánea y la de enfermedad recurrente. En general se describen 6 formas clínicas de la enfermedad: leishmaniosis visceral, leishmaniosis cutánea, leishmaniosis cutánea post Kala-azar, leishmaniosis cutánea difusa, leishmaniosis cutánea diseminada y leishmaniosis cutáneo-mucosa (WHO, 2010; Sánchez-Saldaña et al., 2004).

Los neutrófilos son las primeras células del sistema inmune que se enfrentan a *Leishmania* en el lugar de inoculación del flebotomo, y las células del sistema inmune innato influyen en el curso de la infección y la enfermedad. Un exceso o un déficit de la respuesta inmune puede conducir a presentaciones crónicas de la enfermedad, que son más difíciles de tratar. En el caso de una falta de respuesta específica



mediada por células frente a *Leishmania* se produce la leishmaniosis cutánea difusa; la inmunosupresión durante la leishmaniosis visceral deja al individuo indefenso frente a una carga parasitaria masiva, y una mayor hipersensibilidad mediada por las células inmunes, produce desfiguraciones en las enfermedades cutánea y cutáneo-mucosa (WHO, 2010).

1.4.1. Leishmaniosis visceral

Después de que el flebotomo inocule al parásito en el hospedador vertebrado, hay un periodo de incubación que varía de 4-10 meses. En pocos casos se produce lesión en el lugar de la picadura del vector, ya que la mayoría de las veces pasa desapercibida y tiene una evolución crónica. La progresión a leishmaniosis visceral o “kala-azar” por norma general sucede de 3 a 8 meses después de la infección, momento desde el cual la enfermedad permanece asintomática o con síntomas leves que se resuelven de forma espontánea (Sánchez-Saldaña et al., 2004).

Las manifestaciones clínicas típicas están asociadas con fiebre de intensidad variable que puede durar semanas y se alterna con periodos afebriles, sudores nocturnos, hepatoesplenomegalia (Figura 10), y delgadez progresiva que termina en caquexia. Las linfadenopatías pueden aparecer aunque no de forma constante (Ashford, 2000). En la fase crónica la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar a la fosa iliaca produciendo un abultamiento del abdomen considerable. También se puede producir epistaxis, hemorragia gingival, edema, ascitis, anemia normocítica, normocrómica, neutropenia, trombocitopenia, hipo-albuminemia, elevación de las transaminasas, e hiperpigmentación de la piel. Entre los parámetros serológicos destacan la hipergammaglobulinemia, en especial la activación policlonal de los anticuerpos Ig G, por su importante papel en el diagnóstico de la enfermedad. Este tipo de leishmaniosis es fatal si no se realiza un tratamiento adecuado, y datos recientes indican que la susceptibilidad a esta enfermedad está determinada genéticamente (Sánchez-Saldaña et al., 2004; WHO, 2010).

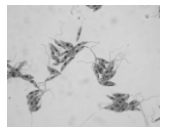


Figura 11. Hepatoesplenomegalia típica de la leishmaniosis visceral (A y B). Imágenes obtenidas de www.leishrisk.net (A), y Sciencephotolibrary (B).

La leishmaniosis visceral humana se asocia con una respuesta mixta Th1 y Th2. Durante la enfermedad, la respuesta Th1 es inexistente o muy escasa mientras que sí se produce una respuesta Th2. Cuando se inicia la curación estos datos se invierten, aumentando la respuesta Th1 y disminuyendo la Th2. La cura después del tratamiento se acompaña de un aumento del interferón- γ y la interleuquina(IL)-12, y la disminución de IL-10. El número de células T CD4+CD25+ se ha observado que se incrementa durante la leishmaniosis visceral activa, y disminuye cuando se cura la enfermedad, por lo que estas células T reguladoras pueden contribuir al estado de inmunosupresión característico de la leishmaniosis visceral (WHO, 2010).

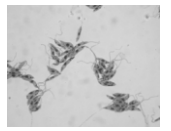
Este tipo de leishmaniosis está causada principalmente por el complejo *L. donovani*, que incluye a las especies *L. infantum*, *L. donovani* y *L. archibaldi* en el Viejo Mundo y *L. infantum* (= *L. chagasi*) en el Nuevo Mundo. También se han declarado algunos casos de leishmaniosis visceral producida por *L. tropica* (WHO, 2010). El primer caso de leishmaniosis visceral en España lo describió Pittaluga en 1912 mediante la visualización del parásito en una muestra obtenida a partir de una punción esplénica, en la comarca de Tortosa. En la Figura 11 se muestra la distribución mundial de la leishmaniosis visceral según la WHO.



Figura 12. Distribución mundial de la leishmaniosis visceral (WHO, página web).

1.4.2. Leishmaniosis cutánea

Los síntomas clínicos de la leishmaniosis cutánea varían según la región, la especie implicada, estado inmunológico del hospedador y su susceptibilidad genética. Esta leishmaniosis suele tener un periodo de incubación de entre 2-3 semanas de promedio, pudiendo variar entre 2 semanas y más de 2 meses. Posteriormente aparece una pequeña lesión primaria que presenta un leve enrojecimiento a su alrededor, frecuentemente pruriginoso. A los pocos días aparece una leve infiltración papulosa de unos 3 mm de diámetro, con mucha frecuencia con diminutas vesículas, que puede dar lugar a una pequeña escoriación debido al rascado, y a una posterior ulceración. Algunas veces la lesión remite espontáneamente y origina una fase asintomática prolongada que puede reactivarse con un trauma local. El inicio de los signos linfáticos producidos por este tipo de leishmaniosis puede aparecer antes, al mismo tiempo o después de las ulceraciones. En estas fases tempranas y en pacientes inmunodeprimidos hay un gran número de macrófagos cargados de parásitos y el infiltrado de linfocitos y células plasmáticas aumenta progresivamente a medida que evoluciona la lesión y sigue siendo alto hasta el final (Sánchez-Saldaña et al., 2004; WHO 2010).



Pasados varios días tras la aparición de la lesión inicial, ésta se ulcera y se cubre de un exudado amarillento y adherente que dará lugar a la formación de la costra. La ulceración se produce por la licuefacción de la capa basal de la piel debido a la destrucción de los macrófagos del hospedador durante la liberación de los amastigotes y posiblemente por la acción dañina de los antígenos liberados sobre los tejidos. Debajo de la costra la infección va a seguir avanzando extendiéndose en superficie y profundidad. La úlcera característica de la leishmaniosis es redondeada, indolora, con bordes bien definidos levantados, indurada, con polimorfos en la zona necrótica y numerosos linfocitos en la periferia. Cuando se desprende la costra aparece un fondo granulomatoso, con exudado seroso no purulento, sin tendencia al sangrado, y de color rojizo (o amarillento en el caso de que haya depósitos de fibrina). La piel alrededor de la lesión presenta coloración y aspecto normal. Durante el periodo de destrucción activa de los parásitos, se producen edemas en la dermis superficial, se dañan el colágeno y la elastina, aumenta la reticulina y se produce fibrosis. En algunos casos hay necrosis del colágeno o de la epidermis, y la hiperplasia pseudoepiteliomatosa es a menudo grave. En esta fase los capilares vasculares pueden presentar inflamación endotelial o puede haber vasculitis. A su vez, la muerte por apoptosis de los queratinocitos se ha implicado en la formación de las úlceras. Con frecuencia los ganglios linfáticos son afectados produciendo linfangitis y linfadenitis regionales (Sánchez-Saldaña et al., 2004; Hernández, 2006; WHO, 2010).



Figura 13. Linfadenopatía. Imagen obtenida de Hernández (2006).



En los primeros meses de evolución de la enfermedad, la úlcera ocasionada tiende a crecer hasta un tamaño máximo dependiendo de la especie de *Leishmania* que ha producido la infección, y del estado del sistema inmune del hospedador vertebrado. Las lesiones se suelen estabilizar debido a la actuación del sistema inmune y conforme empieza a prevalecer la respuesta inmune del hospedador, la enfermedad empieza a remitir hasta su curación espontánea en un periodo de 6 meses a 3 años. Durante esta remisión de la enfermedad, las zonas necróticas son reemplazadas por células de Langerhans y unas pocas células epiteloides. En un número de casos escasos se pueden producir recidivas cutáneas o complicaciones mucosas de aparición más o menos tardía (Sánchez-Saldaña et al., 2004; Hernández, 2006; WHO, 2010).

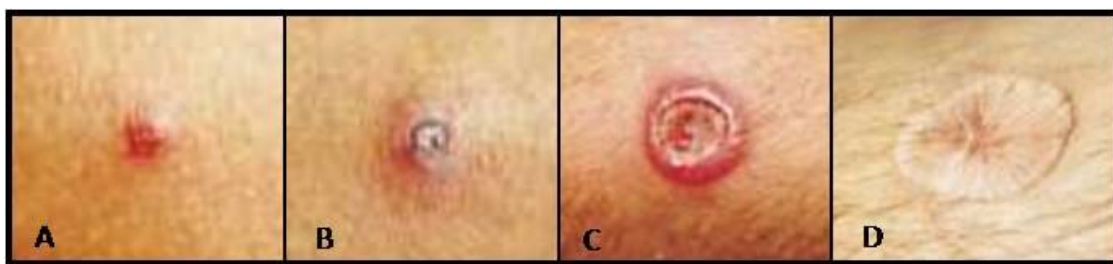


Figura 14. Evolución de una leishmaniosis cutánea: (A) 3-8 días post infección; (B) 2 semanas post infección; (C) 3 semanas post infección; (D) cicatriz típica después de la curación. Imágenes obtenidas de Hernández (2006), modificadas por el autor.

En las lesiones producidas por la leishmaniosis cutánea se han encontrado citoquinas Th1 y Th2 en respuesta a los antígenos de *Leishmania*. La IL-10 y la IL-13 se han asociado con lesiones crónicas, al igual que los linfocitos T reguladores, aunque el rol que desempeñan aún no está claro (WHO, 2010). A diferencia de la leishmaniosis visceral, en la leishmaniosis cutánea activa suele predominar la respuesta Th1.

La leishmaniosis cutánea en el Viejo Mundo está causada por 5 especies pertenecientes al subgénero *Leishmania*: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y *L. donovani*. Por el contrario, en el Nuevo Mundo son 11 las especies que desarrollan esta enfermedad, dando lugar a un amplio rango de manifestaciones.

1.4.3. Leishmaniosis cutánea post Kala-azar (LCPK)

S.D. Barón López (2014)



Las células inflamatorias presentes son principalmente CD3, con abundante IL-10 en las lesiones que disminuye durante el tratamiento, y la IL-4 en cantidades variables. Los pacientes con LCPK presentan niveles elevados de inmunoglobulinas G3 y G1, y aumento de los niveles séricos de IL-10. Altas concentraciones de IL-10 durante la leishmaniosis visceral se correlacionan con el desarrollo posterior de LCPK, al igual que pueden provocar este desarrollo secundario los tratamientos antirretrovirales durante la coinfección con VIH (WHO, 2010).

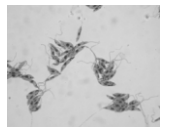


Figura 16. Lesiones típicas de LCPK (WHO).

Este tipo de leishmaniosis puede ocurrir en todas las áreas endémicas de *L. donovani*, pero es más común en el subcontinente indio y en el este de África donde se desarrolla esta enfermedad en el 50% y el 10% de los casos respectivamente. Las lesiones producidas por esta patología, pueden curar de forma espontánea en algunos casos de la zona africana pero raramente en los casos de la India (WHO, 2010).

1.4.4. Leishmaniosis cutánea difusa

Este tipo de leishmaniosis la padecen hospedadores anérgicos con pobre respuesta inmune celular, y se inicia con lesiones localizadas, de aspecto nodular o en placa infiltrada, que poco a poco se diseminan por todo el cuerpo. Esta enfermedad tiene un aspecto similar a la lepra lepromatosa debido a la presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas, y en ocasiones, lesiones



verrucosas de límites imprecisos. El exámen histiopatológico muestra frecuente atrofia de la epidermis y granulomas bien constituidos con una intensa infiltración dérmica de macrófagos vacuolados cargados de parásitos, escasez de linfocitos y ausencia de necrosis y ulceración. Esta enfermedad también se caracteriza por presentar en el lugar de la lesión un elevado número de células plasmáticas, un título alto de anticuerpos específicos de *Leishmania* y concentraciones altas de TNF- α en el suero, así como una producción baja o ausente de interferón- γ por parte de las células mononucleares de la sangre periférica (Salazar y Castro, 2001; Sánchez-Saldaña et al., 2004; WHO, 2010).



Figura 17. Caso de leishmaniosis cutánea difusa. Imagen obtenida de Salazar y Castro (2001).

Aunque los órganos internos no se ven afectados, las lesiones que se producen no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento. Una vez realizado el tratamiento las lesiones presentan inmunidad celular adquirida, con infiltrados de linfocitos y granuloma difuso. El hecho de que se produzca esta clase de leishmaniosis se atribuye a factores propios del hospedador, pero algunos estudios han sugerido que los organismos infecciosos también influyen (Sánchez-Saldaña et al., 2004; WHO, 2010).

La leishmaniosis cutánea difusa se ha descrito asociada solamente con *L. mexicana* y *L. amazonensis* en el Nuevo Mundo, aunque también puede ser causada



por *L. aethiopica* en el Viejo Mundo, o por otras especies de *Leishmania* en casos de inmunosupresión como puede ser por coinfección VIH-*Leishmania* o transplantes. En todos los casos, las formas de esta enfermedad descritas en el Nuevo Mundo y en el Viejo Mundo son similares patológica y clínicamente (WHO, 2010).

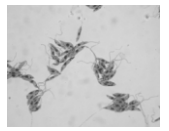
1.4.5. Leishmaniosis cutánea diseminada

La leishmaniosis cutánea diseminada es una forma poco frecuente de leishmaniosis que empieza con una lesión primaria de tipo nódulo o placa con descamación epidérmica en el lugar de alimentación del flebotomo. Tras la diseminación hematogena de los parásitos, semanas o meses después de la infección, se presenta como extensas y numerosas lesiones nodulares o ulceradas por todo el cuerpo (desde más de 20 hasta cientos de lesiones cutáneas), con o sin afección de la mucosa (las lesiones mucosas suelen ser frecuentes).



Figura 18. Lesiones típicas de leishmaniosis cutánea diseminada. Imágenes obtenidas de Sousa et al. (2006) (A y B), y Aghaei et al. (2004) (C).

En esta leishmaniosis se produce una respuesta mediada por células de hipersensibilidad retardada a los antígenos de *Leishmania*, y una producción de anticuerpos específicos normal, aunque esta respuesta puede ser más débil que en la leishmaniosis cutánea localizada, motivo por el cual es capaz de extenderse. En las biopsias de las lesiones se observan pocos parásitos, respondiendo parcialmente al tratamiento con antimoniales y con miltefosina. Las especies asociadas a esta



enfermedad son *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* (González y Vélez, 2006; WHO, 2010).

Aunque algunos autores consideran esta forma clínica sinónima de la leishmaniosis cutánea difusa, otros autores las consideran distintas. Según González y Vélez (2006) la leishmaniosis cutánea diseminada se diferencia de la difusa en que la alteración de la inmunidad celular es menor y las lesiones pueden presentar una descamación epidérmica, mientras que en la difusa las lesiones son nodulares y hay una anergia celular específica contra el parásito.

1.4.6. Leishmaniosis cutáneo-mucosa

Por norma general la leishmaniosis cutáneo-mucosa o “espundia” se presenta varios meses o incluso más de 20 años después de haber cicatrizado la forma cutánea, aunque ocasionalmente aparece cuando las manifestaciones cutáneas todavía están presentes. En aproximadamente un tercio de los casos las manifestaciones mucosas se consideran primarias debido a que no se ha tenido constancia de haber presentado lesiones cutáneas, aunque también es posible que la infección primaria haya sido inaparente o simplemente que se haya manifestado como una lesión mínima que ha pasado desapercibida. La malnutrición, así como lesiones primarias múltiples principalmente por encima de la cintura y el retraso en la curación de las lesiones primarias son algunos de los factores que aumentan el riesgo de padecer este tipo de patología (Salazar y Castro, 2001; Sánchez-Saldaña et al., 2004; WHO, 2010).

Las lesiones mucosas se inician principalmente en el tabique nasal cartilaginoso o en otras partes de las vías aéreas superiores, debido a una diseminación linfática o hematógena. Al inicio solo se aprecia una ligera secreción de moco similar a una rinitis o un resfriado. Posteriormente se produce inflamación en la mucosa, que se vuelve eritematosa, edematosa y dolorosa, con una reacción



exudativa mediada por células no específicas, y afección del tabique nasal. Aquí también se produce abundante seborrea debida a una hipertrofia de los orificios pilosebáceos e hipertrofia vascular que produce necrosis coagulativa de los vasos pequeños, y progresa a granuloma epitelioides organizado en tubérculos o vuelve a una reacción exudativa celular.

Cuando las lesiones están avanzadas se presenta exudación y ulceración de la mucosa, obturación de las fosas nasales, perforación del tabique nasal que al destruirse total o parcialmente produce la caída de la punta de la nariz, y aumento del volumen de la punta y de las alas de la nariz producidas por infiltración, eritema y edema. Esta perforación del tabique nasal y el achatamiento de la punta de la nariz son característicos de este tipo de leishmaniosis. Los pacientes con afección nasal presentan catarro nasal, ardor, prurito, respiración forzada, mucosa nasal congestionada, y costra hemorrágica o úlcera granulomatosa asociada a pequeñas reacciones necróticas e infiltrada de linfocitos, macrófagos y plasmocitos. Si la enfermedad avanza la infección se extiende al labio superior, paladar, encías, pilares del velo del paladar, úvula, faringe, laringe y tráquea. El labio superior y parte de la nariz suelen ulcerarse y destruirse poco a poco al igual que la úvula, mientras que las lesiones del paladar suelen ser más proliferativas que destructivas. Las lesiones en la lengua son raras y las afecciones en la garganta producen ronquera y dificultad para respirar y deglutir los alimentos, empeorando el estado general del hospedador. Este tipo de leishmaniosis casi nunca se cura de manera espontánea, y puede ser mortal si el hospedador no recibe el tratamiento adecuado (Sánchez-Saldaña et al., 2004; WHO, 2010).

Esta patología se caracteriza por una marcada hipersensibilidad cutánea retardada, linfoproliferación exuberante y citoquinas mixtas Th1 y Th2. También se ha observado que los linfocitos T CD4 y CD8 producen abundante interferón- γ en las lesiones, y que hay una alta concentración de TNF- α en suero en respuesta a los antígenos de *Leishmania* (WHO, 2010).

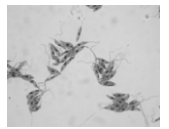


Figura 19. Lesiones producidas por una leishmaniosis mucocutánea. Imágenes obtenidas de Zea et al., 2009 (A) y www.dermaamin.com (B).

La leishmaniosis cutáneo-mucosa se produce principalmente por las especies *L. braziliensis* y *L. panamensis*, aunque también se ha observado una sintomatología similar con otras especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo en pacientes inmunosuprimidos. Por norma general, las lesiones mucosas son menos frecuentes en el Viejo Mundo aunque algunas especies, como *L. tropica*, *L. infantum* y *L. major*, la pueden causar en estados de inmunosupresión tanto en las vías aéreas superiores como en mucosa genital (WHO, 2010). Se ha observado que *L. donovani* de manera frecuente produce esta patología en el este de África (Mahdi et al., 2005; Abbas et al., 2009). También en España se han producido casos espontáneos de leishmaniosis cutáneo-mucosa causados por *L. infantum* (Aliaga et al., 2003), al igual que en otros países del mediterráneo como Francia (Faucher et al., 2011) e Italia (Casolari et al., 2005).

1.4.7. Coinfección VIH-Leishmania

Los casos en los que se produce esta coinfección, el virus de la inmunodeficiencia Humana (VIH) y *Leishmania* se refuerzan mutuamente en su acción perjudicial en el hospedador. En este tipo de coinfección la producción de leishmaniosis visceral es más frecuente debido a la inmunodepresión que produce esta infección viral, y a su vez hace que la respuesta a los tratamientos



antirretrovirales sea menos eficaz. Por norma general, los síntomas de leishmaniosis visceral que sufren estos pacientes son los mismos que los mencionados anteriormente en el apartado de la leishmaniosis visceral, aunque la esplenomegalia aparece con menor frecuencia. En los pacientes que sufren una marcada inmunosupresión, la infección por *Leishmania* se puede extender a sitios atípicos, tales como tracto gastrointestinal, espacio peritoneal, pulmón, cavidad pleural y piel. Si la infección se produce en el esófago, se puede causar disfagia (deglución difícil) y odinofagia (deglución dolorosa), lo que la diferencia de la infección por candidiasis. En el caso de leishmaniosis cutánea en pacientes con SIDA, se presentan numerosas lesiones, polimórficas y recurrentes. También es posible que se produzcan formas cutáneas difusas y leishmaniosis cutánea post Kala-azar asociadas a leishmaniosis visceral (WHO, 2010).

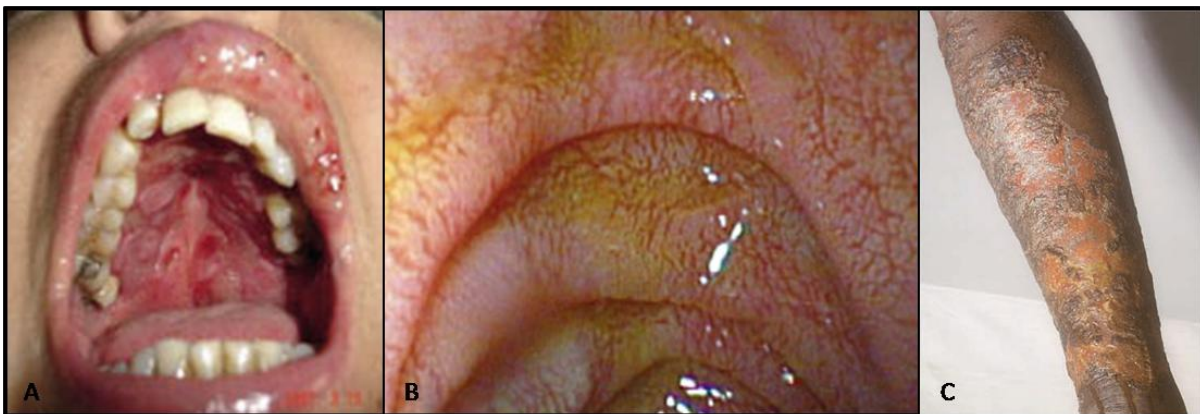
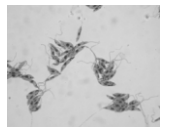


Figura 20. Lesiones producidas por coinfección *Leishmania*-VIH: (A) lesiones cutáneo-mucosas (Baltà-Cruz et al., 2009); (B) lesiones en duodeno post kala-azar (Olmo Martínez et al., 2009); (C) lesiones cutáneas diseminadas (Schraner et al., 2005).

1.5. Diagnóstico de la leishmaniosis

El diagnóstico definitivo de la leishmaniosis se basa en la demostración directa o indirecta de la presencia de *Leishmania* como causante de esta patología. Para tal fin se han de tener en cuenta los antecedentes epidemiológicos, la sintomatología producida por la enfermedad, y el resultado de las distintas pruebas diagnósticas que se realicen. Dependiendo de cuáles sean los síntomas ocasionados y la presentación clínica de la enfermedad, va a variar la elección del método diagnóstico a realizar,



pudiendo elegir entre los exámenes de detección directa, los inmunológicos y los de biología molecular para determinar la presencia de este parásito. Por lo tanto, los principales métodos de diagnóstico de laboratorio de la leishmaniosis son: métodos parasitológicos (demostración de la presencia del parásito en los tejidos de interés mediante observación al microscopio óptico, cultivo *in vitro* o inoculación en animales); métodos inmunológicos (inmunodiagnóstico por detección de antígenos del parásito en muestras de tejido, sangre u orina; por detección de anticuerpos frente a *Leishmania*; o mediante ensayos de inmunidad específica de *Leishmania* mediada por células); y métodos moleculares (detección de ADN del parásito en muestras de tejido, sangre u orina) (Sundar y Rai, 2002). Algunos de estos métodos no pueden diferenciar si la infección es antigua, reciente o actual; y por otro lado, el avance de los métodos moleculares puede ayudar al desarrollo de mejoras en las técnicas de diagnóstico (Herwaldt, 1999).

Se han publicado diferentes estudios que han evaluado y comparado la especificidad y sensibilidad de diferentes técnicas diagnósticas, comprobándose en muchos casos que éstas pueden mostrar resultados contrarios, con aparición de falsos negativos y falsos positivos, y bajos valores de concordancia (Zerpa et al, 2002; Morales-Yuste et al., 2012).

1.5.1. Diagnóstico mediante sintomatología

El diagnóstico de la leishmaniosis mediante su sintomatología presenta la dificultad de que estos signos y síntomas clínicos no son patognomónicos y pueden ser confundidos con los de otras patologías (Maia y Campino, 2008). Éste es el caso de algunas enfermedades comunes como la malaria, el tifus o la tuberculosis, que comparten síntomas clínicos con la leishmaniosis visceral y que pueden estar presentes junto con esta leishmaniosis (Sundar y Rai, 2002). También hay una serie de trastornos cuya sintomatología pueden ser confundida con leishmaniosis cutánea, tales como: picaduras de insectos sobreinfectadas, reacciones de cuerpos extraños,

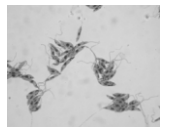


miasis, infecciones por hongos o micobacterias, lesiones ulcerativas tropicales y traumáticas, sarcoidosis, y neoplasias (Herwaldt, 1999). Debido a la existencia de estas semejanzas en los signos y síntomas ocasionados, en cualquier sospecha clínica de leishmaniosis se ha de tener en cuenta las características epidemiológicas del caso, y se ha de realizar la confirmación mediante otros métodos de diagnóstico (Singh y Sivakumar, 2003; Srividya et al., 2012). Los síntomas clínicos característicos de cada una de las patologías producidas por las distintas especies de *Leishmania* ya se han descrito en el apartado anterior. Aunque los síntomas descritos se han detallado principalmente en humanos, el diagnóstico de la leishmaniosis humana y de otros hospedadores no presentan grandes diferencias (Alvar et al., 2004).

1.5.2. Diagnóstico parasitológico clásico

Los métodos parasitológicos clásicos se basan principalmente en la demostración de la presencia del parásito en los tejidos del hospedador, principalmente por la observación directa mediante microscopio óptico, por el aislamiento mediante cultivo *in vitro* de estos parásitos, o por su inoculación en animales de experimentación o xenodiagnóstico.

Observación directa del parásito: Para la leishmaniosis visceral, los tejidos más empleados para la observación directa de parásitos han sido hígado, bazo, médula ósea y nódulos linfáticos, siendo el bazo el que proporciona una mayor sensibilidad. En los casos de leishmaniosis visceral, donde los parásitos son abundantes, la detección en estos tejidos es más fácil que en los casos de leishmaniosis viscerotrópica, cutáneo-mucosa o cutánea crónica, en las que la presencia de amastigotes es inferior (Herwaldt, 1999). El principal problema para la obtención de las muestras de tejido es el riesgo de hemorragias y posterior infección sobre todo cuando se trata de órganos hematopoyéticos y de difícil acceso (Hernández-Rodríguez y Martínez-Moreno, 1992; Sundar y Rai, 2002). Otros tejidos empleados para la observación directa del parásito y que comportan un menor riesgo son la



sangre periférica (mediante leucoconcentrado) o muestras cutáneas en el caso de la leishmaniosis cutánea (Reale et al., 1999; Alvar et al., 2004; Manna et al., 2004). La técnica más comúnmente usada para la detección del parásito es la observación al microscopio óptico de los amastigotes (forma tisular del parásito) en los tejidos infectados teñidos con Giemsa u otro colorante de similares características. Mediante la tinción con Giemsa, los amastigotes aparecen típicamente con el citoplasma de color azul pálido, y el núcleo y kinetoplasto de color rosáceo o azul violeta (Herwaldt, 1999).

Cultivo *in vitro* del parásito: En el aislamiento mediante cultivo *in vitro* se establecen una serie de limitaciones como son el riesgo de contaminación de los cultivos, así como el tiempo necesario para que los cultivos de los parásitos crezcan lo suficiente para su detección e identificación (1-6 semanas) o para proporcionar un resultado negativo (3 meses). La parte más difícil de llevar a cabo es el establecimiento inicial del organismo en el cultivo, donde los amastigotes tienden a transformarse en promastigotes que inician la multiplicación. Sin embargo tiene la ventaja de que una vez que se ha producido el crecimiento de los parásitos en el cultivo, pueden ser utilizados para otros estudios y ser identificados específicamente mediante técnicas de electroforesis de isoenzimas o PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Berman, 1997). La elección del medio de cultivo a usar es especialmente importante, aunque es difícil predecir en que medio va a crecer más fácilmente *Leishmania* (Evans et al., 1989). Algunos de los medios utilizados son: NNN (Medio de Nicolle, Novi y MacNeal); EMTM (Medio de Tobie Modificado por Evans); SDM (Medio para *Drosophila* de Schneider); y RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) (Evans et al., 1989; Gupta et al., 2001). Normalmente se les adiciona suero bovino fetal al 10-20%. Sin duda, NNN y EMTM son los más usados para el establecimiento inicial. Además de estos medios hay otros medios desarrollados por distintos autores en sus propios estudios, como por ejemplo el M199, UM55, F29, JH30, RBML y GALF-1 entre otros (Gupta et al., 2001; Tasew et al., 2009). Cabe destacar que el GALF-1 se



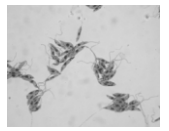
ha postulado como un medio de bajo coste especialmente indicado para los países más deprimidos, ya que reduce el coste del cultivo de *Leishmania* en aproximadamente un 80-90% comparado con el RPMI y el LSSM (Medio Semi Solido de Locke) (Tasew et al., 2009).

Xenodiagnóstico mediante inoculación en animales: Entre los animales de experimentación más utilizados para la inoculación de *Leishmania* se encuentran los ratones Balb/c y los hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*). Las rutas de inoculación más comunes son la intraperitoneal, intracardiaca, o a través de las membranas mucosas (Sundar y Rai, 2002; Alvar et al., 2004). Al cabo de un periodo de entre 1-3 meses se pueden observar los parásitos o pueden aislarse a partir de hígado, bazo, medula ósea o ganglios linfáticos (Hernández-Rodríguez y Martínez-Moreno, 1992). Cuando las cepas que se quieren cultivar presentan un difícil crecimiento o cuando el riesgo de contaminación es elevado, es recomendable el uso de la inoculación en animales de experimentación, aunque en condiciones normales no es un método de diagnóstico habitual debido a que se requieren varios meses para obtener un resultado positivo.

Xenodiagnóstico con el vector: Este método consiste en la detección y aislamiento de *Leishmania* usando al flebotomo como su vector artrópodo natural. A pesar de que este método se ha usado para resolver importantes cuestiones relativas al papel del estado clínico, y el tratamiento con fármacos en la transmisión del parásito, generalmente no se trata de un método de diagnóstico de elección, ya que se requieren laboratorios especializados en los que haya disponibles colonias estables de flebotomos (Maia y Campino, 2008; Molina et al., 1994; Molina y Alvar, 1996).

1.5.3. Diagnóstico inmunológico

Los métodos de diagnóstico inmunológico se basan en la detección de una respuesta inmune celular o humoral específica frente a *Leishmania* (Singh y



Sivakumar, 2003; Rodríguez-Cortés et al., 2007), o en la detección de antígenos propios del parásito en algún órgano o tejido del hospedador. Estos métodos se basan principalmente en: detección de anticuerpos, detección de antígenos y detección de inmunidad celular.

Detección de anticuerpos: En términos generales los métodos basados en la detección de anticuerpos informan de la exposición al parásito (Baneth y Aroch, 2008; Quinnell y Courtenay, 2009), pero la utilización del título umbral nos permite establecer un límite entre infección activa o pasada. Otro problema a tener en cuenta es la falta de uniformidad a la hora de establecer los umbrales de positividad, lo que provoca diferencias en la seroprevalencia, así como los porcentajes de hospedadores con títulos dudosos (cerca de la positividad) (Martín-Sánchez et al., 2001). Algunas de las principales técnicas que se basan en este tipo de detección son: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Aglutinación directa, ELISA (Inmunoensayo ligado a enzimas), kits inmunocromatográficos y western blot (inmunotransferencia).

Según la OMS, la **inmunofluorescencia indirecta** es la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de la leishmaniosis, a pesar de los inconvenientes que presenta su realización. Una de las principales limitaciones de esta técnica es la necesidad de poseer un microscopio de fluorescencia que es un equipamiento costoso. A pesar de este inconveniente se ha usado en multitud de estudios. Como dato favorable está el hecho de que en tres horas es capaz de obtener el resultado de decenas de sueros.

La **aglutinación directa** presenta una buena especificidad, sensibilidad y bajo coste. Al no requerir un equipamiento especializado, se trata de una técnica apropiada para desarrollar estudios de campo. También se han diseñado variantes de esta técnica, como es el “Fast Agglutination Screening Test”, que permite obtener los resultados a las 3 horas (reduciendo el tiempo de incubación habitual de 18 horas), y que emplea sangre sin diluir (Morales-Yuste, 2012). La aglutinación directa mediante



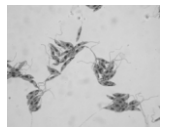
el uso de anticuerpos monoclonales específicos de especie, ha demostrado ser una técnica muy sensible para identificar a las especies de *Leishmania* responsables de una determinada patología (Sundar y Rai, 2002).

La **ELISA** es un método útil y sensible en el serodiagnóstico de la leishmaniosis, aunque esta sensibilidad está condicionada por la elección del antígeno. Su gran versatilidad para adaptarse a diferentes antígenos ha permitido el ensayo con esta técnica de varios polipéptidos recombinantes en los últimos años (Morales-Yuste, 2012).

Los **kits inmunocromatográficos** utilizan antígenos recombinantes fijados a una tira de nitrocelulosa, que permiten capturar los anticuerpos del suero problema. Este método es ideal para el diagnóstico de campo debido a su formato sencillo y la rapidez a la hora de obtener resultados. Los principales problemas que presentan es la necesidad de frío para su conservación y el elevado coste de las tiras reactivas (Morales-Yuste, 2012). Una de la proteínas recombinantes más utilizadas es la rK39, siendo consideradas las tiras reactivas con esta proteína una de las pruebas más precisas para el serodiagnóstico de la leishmaniosis visceral (Maia et al., 2012).

El **western blot** está restringido al uso en investigación por la duración del proceso, su elevado coste y la necesidad de personal especializado para su realización. La principal ventaja de este método es que permite documentar simultáneamente la respuesta de anticuerpos expresados por el hospedador frente a los distintos componentes antigénicos del parásito.

Detección de antígenos: Estas técnicas presentan una mayor especificidad que las basadas en la detección de anticuerpos, siendo por lo tanto adecuadas en pacientes con una baja respuesta humoral. Entre estas técnicas está el test de aglutinación en partículas de látex (KATEX) para la detección de antígenos de *Leishmania* en orina, que presenta una alta sensibilidad y especificidad en pacientes con leishmaniosis visceral. Igualmente presenta una alta utilidad para el diagnóstico y



monitorización de pacientes sometidos a tratamiento contra *Leishmania*, y en infecciones subclínicas de pacientes con coinfección VIH-*Leishmania*. (Attar et al., 2001; Sundar y Rai, 2002; Riera et al., 2004).

Detección de la inmunidad celular: Los métodos de diagnóstico basados en la detección de la inmunidad celular son principalmente la reacción de Montenegro y la estimulación linfocitaria.

La **reacción de Montenegro** se trata de un método simple y barato que muestra la respuesta de hipersensibilidad retardada del hospedador frente a la leishmanina (suspensión estéril de promastigotes de *Leishmania* completos y muertos o lisados) inoculada vía intradérmica. Este método es útil en la detección de la respuesta inmune celular frente a *Leishmania* en hospedadores resistentes a la enfermedad, en casos de leishmaniosis cutánea, y en casos de leishmaniosis visceral tras un tratamiento eficaz, aunque no es válido en las fases iniciales y activas de leishmaniosis visceral. El principal problema de este método es que son necesarias 48 horas para la obtención de resultados y que los individuos sometidos a esta prueba pueden quedar sensibilizados y dar falsos positivos en pruebas posteriores (Morales-Yuste, 2012). Su uso queda restringido a estudios epidemiológicos a fin de determinar el grado de contacto entre el parásito y el ser humano (Acedo-Sanchez et al., 1996; Morillas-Márquez et al., 1996).

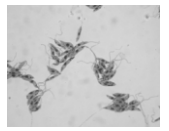
La **estimulación linfocitaria** mide la proliferación de los linfocitos cuando son estimulados con antígenos solubles de *Leishmania* y mitógenos, mediante el índice de estimulación (células estimuladas/células no estimuladas). Al igual que en el caso anterior, este método es válido en hospedadores resistentes a la enfermedad, en hospedadores asintomáticos y en hospedadores que responden bien al tratamiento anti-*Leishmania*, aunque presenta la limitación de una falta de consenso a la hora de establecer los umbrales de positividad y la posibilidad de que los resultados se vean alterados por las características inmunológicas y genéticas propias del hospedador.



1.5.4. Diagnóstico molecular

La incorporación de los métodos moleculares para la detección genérica o específica de ADN de *Leishmania*, aplicada al diagnóstico de la leishmaniosis, se ha traducido en un incremento de los valores de prevalencia respecto a los obtenidos con las técnicas clásicas (Martín-Sánchez et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2001; Martín-Sánchez et al., 2002; Fernández-Bellón et al., 2008; Chitimia et al., 2011). Este incremento se ha visto favorecido por su capacidad para revelar formas asintomáticas de la leishmaniosis, no detectables por la mayoría de los métodos serológicos clásicos (Inieta et al., 2002). Desde la década de los 80 en la que se introdujera el uso de las técnicas basadas en la detección de ADN mediante hibridación y posteriormente la PCR, se ha avanzado mucho en la aplicación del diagnóstico molecular en el área de la parasitología. Aunque los métodos de hibridación presentan una compleja realización que impide su uso habitual en rutinas de diagnóstico, tienen una considerable sensibilidad (Sundar y Rai 2002). Entre los métodos moleculares más usados en la actualidad están la PCR, introducida en 1985, y la más reciente PCR a tiempo real.

La aplicación de la PCR para el diagnóstico de la leishmaniosis, ha aportado un aumento de la sensibilidad de estos métodos moleculares (Solano-Gallego y Baneth, 2008), principalmente mediante la selección de cebadores que amplifican dianas moleculares muy repetidas en el genoma del parásito. Un ejemplo de estas dianas serían las secuencias conservadas situadas en los minicírculos del ADN del kinetoplasto (ADNk), ya que estos minicírculos presentan miles de copias (Sundar y Rai 2002). Esta mayor cantidad de copias otorgan una mayor sensibilidad a la detección de secuencias de ADNk que las basadas en ADN ribosómico (ADNr) (Lachaud et al., 2002; Miró et al., 2008). Una de las grandes ventajas de esta técnica es la posibilidad de analizar un amplio abanico de muestras distintas (aspirados de nódulos linfáticos, aspirados de médula ósea, sangre completa, leucoconcentrado, muestras cutáneas, biopsias o aspirados de hígado o bazo, piel, orina o incluso frotis



o improntas), pudiendo variar la sensibilidad según el tejido que utilizemos (Manna et al., 2004; Strauss-Ayali et al., 2004; Solano-Gallego y Baneth, 2008). Por lo tanto, la eficacia de la PCR va a depender de los cebadores seleccionados, número de copias de la secuencia diana, método de extracción de ADN, tipo de tejido seleccionado y protocolo de PCR empleado (Maia y Campino, 2008).

Una de las modificaciones descritas de la PCR, es la “PCR-ELISA”, que supone concatenar tres técnicas seguidas: una PCR, una hibridación con sonda oligonucleótida, y una ELISA. Se ha descrito una PCR-ELISA específica de *Leishmania infantum* que ha mostrado tener una sensibilidad mayor que IFI, cultivo u observación microscópica, siendo capaz de detectar un mínimo de 0,1 promastigotes ó 1 fg de material genómico (Martín-Sánchez et al., 2001; Sundar y Rai, 2002).

Una de las principales restricciones que presenta la PCR, es la aparición de falsos positivos por la contaminación con ADN externo a la muestra de partida, en muchos casos debido a la excesiva manipulación de las muestras analizadas. Para reducir las manipulaciones y los tiempos de procesado, se ha diseñado la “PCR en tiempo real” que se basa en el empleo de reactivos fluorescentes que permiten la detección en tiempo real de los productos de amplificación. Esta técnica ofrece la posibilidad de cuantificar la carga parasitaria de la muestra original mediante la construcción de una curva de estándares, posibilitando el seguimiento y monitorización de pacientes sometidos a tratamiento frente a *Leishmania* (Bell y Ranford-Cartwright, 2002; Monis et al., 2005; Gomes et al., 2008; Morales-Yuste, 2012). El principal problema que presenta esta técnica es el elevado coste tanto de los reactivos como del equipamiento necesario (Srividya et al., 2012).

1.6. Tratamiento de la leishmaniosis

Las leishmaniosis representan en su conjunto un importante reto terapéutico, aunque las formas cutáneas más habituales raramente presentan complicaciones de



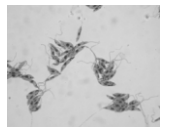
tratamiento. Desde la cauterización de las leishmaniosis cutáneas por los herreros con un hierro candente hasta la actualidad, pasando por el uso de distintos fármacos, las modalidades terapéuticas han seguido evolucionando. Hoy en día muchos de estos métodos, como son la radioterapia, la radiación UV o la helioterapia, ya sólo pertenecen al pasado (García Almagro, 2004). A continuación vamos a repasar cuales son los principales tratamientos farmacológicos y algunos tratamientos físicos que se realizan o se han realizado contra la leishmaniosis.

1.6.1. Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico contra la leishmaniosis es un tema desconcertante debido a la complejidad de la enfermedad y la insuficiencia en la información publicada. Muchas publicaciones realizadas al respecto dan la errónea información de que existen muchas buenas opciones de tratamiento aunque la realidad es distinta, siendo pocos los agentes terapéuticos que han sido evaluados adecuadamente en los ensayos clínicos. En la mayoría de los casos los principios activos más eficaces generalmente son también los más tóxicos y difíciles de administrar, y los estudios realizados sobre ellos muchas veces se han hecho sólo en algunas de las muchas combinaciones de los síndromes de la enfermedad, especies y regiones geográficas (Herwaldt, 1999).

Desde que en 1913 se utilizaran los compuestos antimoniales por primera vez en el tratamiento de la leishmaniosis y en 1922 se utilizara el primer antimonial pentavalente, se han utilizado varios fármacos. A continuación vamos a describir brevemente algunos de los más importantes:

Antimoniales pentavalentes: Estos fármacos son derivados del ácido estibónico en el cual el antimonio está unido a una molécula de glucosa. Los más conocidos son el Glucantime (o Antimoniato de Metilglucamina) y el Pentostam (o Estibogluconato Sódico). Estos antimoniales pentavalentes son eficaces *in vitro* frente



a multitud de especies de *Leishmania*, aunque su mecanismo de acción todavía está bajo estudio. Se consideran dos alternativas: que se trata de una prodroga que se convierte en antimonial trivalente en el interior del parásito y en los compartimentos ácidos de las células de mamíferos, o que actúa directamente como antimonial pentavalente. Los mecanismos antileishmania de los antimoniales trivalentes están probablemente relacionados con su interacción con biomoléculas que contienen sulfhidrilos (incluyendo tioles, péptidos, proteínas y enzimas), mientras que en el caso de los antimoniales pentavalentes se considera que está relacionada con su interacción con ribonucleósidos. Su aplicación es mediante vía intravenosa o intramuscular, aunque en perros también de forma subcutánea (Davidson, 1998; Frézard et al., 2009). Los antimoniales pentavalentes son el primer fármaco de elección en el tratamiento de la leishmaniosis canina en España.

Anfotericina B: La Anfotericina B liposomal es un potente agente anti-*Leishmania*, y un fármaco alternativo de primera línea frente a las resistencias a los antimoniales. Su eficacia y su menor toxicidad han hecho que sea el primer fármaco de elección para el tratamiento de la leishmaniosis visceral en España. Originariamente se trata de un antibiótico y antifúngico extraído de la bacteria *Streptomyces nodosus*. Su mecanismo de acción es la unión a los ergosteroles de la membrana del parásito alterando con ello su permeabilidad. Se comenzó a usar como droga de elección en la leishmaniosis cutáneo-mucosa avanzada, para imponerse su uso frente a prácticamente todos los tipos de leishmaniosis. Su vía de administración es intravenosa. Al conjugarse con liposomas mejora de forma clara su índice terapéutico, y además disminuye su toxicidad en humanos (Ramos et al., 1994; Balaña-Fouce et al 1998; Davidson, 1998; Shakya et al., 2011).

Paramomicina: Es una aminoglucósido obtenido de *Streptomyces rimosus*, y actúa sinérgicamente con los antimoniales, aunque también es eficaz sola. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición del metabolismo del parásito y la respiración mitocondrial. Se usó en los años 80 contra la leishmaniosis cutánea



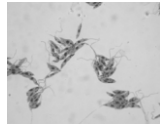
por *L. major* en Israel, y recientemente se ha postulado como tratamiento alternativo de la leishmaniosis visceral en la India. No ha sido estudiada en leishmaniosis cutáneo-mucosa, ni cutánea post kala-azar. (Davidson, 1998; Shakya et al., 2011).

Pentamidina: Es una diamida aromática usada hasta hace poco como fármaco de 2ª línea frente a la leishmaniosis visceral, o en los casos en los que hay resistencia a los antimoniales pentavalentes. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la síntesis de proteínas y fosfolípidos. Sus efectos tóxicos son superiores a los de los antimoniales. Su vía de administración es intravenosa, aunque recientemente se ha aplicado por vía inhalatoria (Singh et al., 2012).

Miltefosina: Es una alquil-fosfocolina que originariamente se desarrolló como anticancerígeno. Se trata del primer fármaco oral utilizado en el tratamiento de la leishmaniosis visceral y está considerado como el mayor progreso en quimioterapia anti-*Leishmania* en los últimos años. La actividad de la miltefosina es debida a su acumulación intracelular, y aunque se desconoce su mecanismo de acción exacto, se sabe que provoca la apoptosis en amastigotes y reducción del contenido lipídico de las membranas de los promastigotes (Singh et al., 2012).

Sitamaquina: Se trata de una aminoquinolina, y es un fármaco desarrollado para el tratamiento de la leishmaniosis visceral. En grandes concentraciones afecta a la movilidad, morfología y crecimiento de los parásitos. Actualmente está en fase III, cuyos resultados preliminares sugieren una actividad eficaz aunque no se descarta la nefrotoxicidad (Singh et al., 2012; WHO), y ha sido retirado por sus efectos secundarios.

Domperidona: Recientemente los laboratorios Esteve han comercializado un jarabe cuyo principio activo es la domperidona (Leishguard), un derivado bencimidazólico antagonista de la dopamina que bloquea específicamente los receptores dopaminérgicos D2 a nivel periférico con actividad antiemética y procinética, sin efectos extrapiramidales y con un alto perfil de seguridad. Se trata de



un fármaco de uso veterinario, que impediría que los perros sanos desarrollen la leishmaniosis, mientras que disminuiría la gravedad de la infección en animales que ya han sido infectados por *Leishmania* y están en su etapa inicial, pudiendo llegar incluso a revertir la enfermedad según se ha sugerido (Gómez-Ochoa et al., 2009; Laboratorios Esteve). En el actual arsenal farmacéutico español, también se encuentra comercializado el medicamento “Domperidona Gamir”, cuyo principio activo es la domperidona, y que se indica como fármaco para el “alivio de ciertos síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos, pesadez de estómago...”, sin mencionarse nada relacionado con la leishmaniosis.

Alopurinol: Es un isómero de la hipoxantina y un inhibidor enzimático de la xantina oxidasa. Se comercializa bajo el nombre de Zyloric® y se suele utilizar para contrarrestar el exceso de ácido úrico en el plasma sanguíneo de humanos. Se ha probado su eficacia frente a leishmania en varios estudios con diferentes resultados (Balaña-Fource et al., 1998). Se está utilizando en la leishmaniosis canina como preventivo, o como terapia de mantenimiento tras el tratamiento con Glucantime.

1.6.2. Tratamiento físico

Además de los tratamientos farmacológicos también se realizan o se han realizado tratamientos físicos frente a la leishmaniosis cutánea. Según García Almagro (2004) algunas de las principales terapias físicas son:

Crioterapia: Este tratamiento se puede realizar con nieve carbónica, óxido nitroso o nitrógeno líquido, obteniendo buenos resultados en algunos estudios no controlados. Esta terapia produce de manera frecuente hipopigmentación persistente de la piel. Se ha utilizado con éxito en Grecia (Panagiotopoulos et al., 2005) y Yemen (Al-Qubaty et al., 2012). La nieve carbónica se usa en el Hospital Clínico San Cecilio de Granada desde hace más de 30 años, con muy buenos resultados (Alcalde-Alonso, 1988).



Termoterapia: Se produce una hipertermia de la zona afectada mediante agua caliente, radiación infrarroja o ultrasonidos. Aunque no se tienen datos de estudios controlados ni de evolución a largo plazo, se ha obtenido buenos resultados con este tipo de tratamiento en Afganistán (Reithinger et al., 2005), en soldados de EEUU infectados en Irak o Kuwait (Aronson et al., 2010) y en Colombia (López et al., 2012), entre otros países.

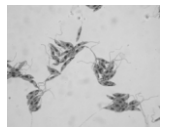
Electroterapia: Se realiza mediante la electro-estimulación directa de las lesiones, en sesiones de 10 minutos de duración e intensidad de 5-15 miliamperios, obteniendo buenos resultados (Sharquie et al., 1998).

Terapia fotodinámica y láser: Se ha utilizado con aparentes buenos resultados y puede ser una nueva alternativa terapéutica, aunque se trata de una terapia cara por lo que es más adecuado el uso de otras alternativas más seguras, económicas y eficaces. El laser de CO₂ se ha usado en diferentes estudios mostrando que es un tratamiento eficaz y con secuelas infrecuentes (Alavi-Naini et al., 2012).

Cirugía: Este procedimiento sólo se realiza en las biopsias o en las extirpaciones de pequeñas lesiones cutáneas que no hayan podido diagnosticarse por frotis, aunque ha de ser acompañado por otras terapias, ya que la eliminación del tejido por sí sola no es curativa.

1.7. Vectores

Como ya se ha comentado anteriormente, las especies del género *Leishmania* presentan un ciclo heteroxeno, lo que implica que parte del mismo se ha de realizar en un hospedador invertebrado que actúa como vector del parásito. Estos hospedadores invertebrados son los flebotomos, insectos dípteros pertenecientes a la familia *Psychodidae* (o *Phlebotomidae* según algunos autores), cuyas principales especies vectoras pertenecen al género *Phlebotomus* en el nuevo mundo y al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. La distribución de los flebotomos se extiende hacia el



norte hasta casi 50 grados de latitud (49° 43' 15"N), y hacia el sur hasta aproximadamente 40 grados (40° S), aunque se suelen localizar principalmente en las partes cálidas del mundo, incluidos el sur de Europa, Asia, África, Australia, América central y Sudamérica (Killick-Kendrick, 1999; Morillas-Marquez et al., 2010; Depaquit et al., 2005). Su distribución altitudinal está comprendida entre valores por debajo del nivel del mar (por la zona del Mar muerto), hasta altitudes de 3300 metros en Afganistán (*Phlebotomus rupester*) (Killick-Kendrick, 1999).

A pesar de que la principal transmisión de esta enfermedad se realiza a través de la picadura de sus flebotomos vectores, se ha comprobado que se puede producir la infección accidental por otras vías tales como transmisión mecánica realizada por la alimentación en heridas infectadas y posterior posado en heridas sanas de la mosca *Stomoxys calcitrans* (Berberian, 1938), transfusión de sangre (Mestra et al., 2011) y transmisión congénita (Meinecke et al., 1999; Osorio et al., 2012). La transmisión a partir de agujas infectadas con *Leishmania* en drogadictos se ha considerado como un nuevo ciclo antroponótico artificial, siendo de gran transcendencia en la coinfección VIH-*Leishmania* (Alvar et al., 1997). También se ha mencionado la presencia de *Leishmania* en garrapatas y pulgas, así como su posible implicación en la transmisión de este parásito (Otranto y Dantas Torres, 2010; Colombo et al., 2011; Solano-Gallego et al., 2012). Según la WHO (2010), los criterios generalmente aceptados para incriminar vectores de *Leishmania* son:

- **El vector ha de ser antropofílico.** Este aspecto se determina mediante la captura por la noche cuando van a picar a humanos o por el análisis de la sangre ingerida por las hembras que se han capturado en casas.
- **El vector debe picar al reservorio.** La mayoría de las leishmaniosis son zoonosis por lo que el hecho de que un supuesto vector se alimente del reservorio evidencia su posible papel vectorial. Para determinar las preferencias de alimentación se utiliza la comparación de las capturas en trampas cebadas con diferentes animales. Mediante el análisis de la sangre



ingerida por las hembras, se pueden determinar los animales de los que se alimenta el vector, pero no la preferencia de alimentación.

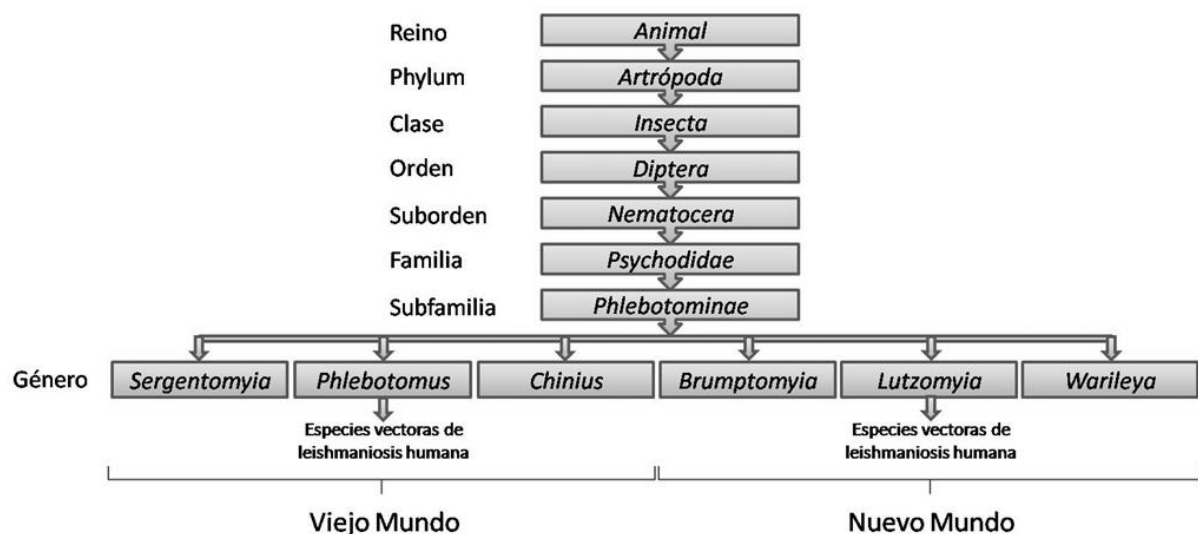
- **El vector se debe infectar en la naturaleza por la misma *Leishmania* que afecta a los humanos.** Las técnicas que se suelen usar para determinar la especie son las isoenzimáticas o análisis de ADN. Los resultados más significativos se obtienen de hembras sin sangre, o con ésta digerida, ya que los parásitos podrían detectarse en la sangre fresca ingerida por flebotomos no vectores, a pesar de que en éstos no puedan completar su ciclo.
- **El vector debe ser compatible con el crecimiento del parásito que transmite.** Cuando los flebotomos vectores están infectados por *Leishmania* transmitida en la naturaleza, el parásito persiste después de que la sangre haya sido digerida. Estos estudios se pueden complementar con infecciones experimentales.
- **El vector ha de ser capaz de transmitir al parásito mediante picadura.** Verificar este aspecto actualmente es difícil para determinadas especies de vector, por su dificultad de cultivo y por la dificultad de persuadir a las hembras para que piquen más veces logrando así la transmisión.

Hasta la fecha, ningún estudio ha demostrado fehacientemente que haya otro vector de *Leishmania* distinto a los flebotomos.

1.7.1. Taxonomía de los flebotomos

Los flebotomos son pequeños insectos hematófagos pertenecientes al orden *Diptera*, familia *Psychodidae* y subfamilia *Phlebotominae*, aunque algunos autores prefieren darle categoría de familia al grupo *Phlebotomidae*. La subfamilia *Phlebotominae* o familia *Phlebotomidae* se caracteriza por la presencia de piezas bucales largas, mandíbulas bien desarrolladas, palpos divididos en 5 segmentos, antenas cilíndricas, y venas radiales de las alas distribuidas en 5 ramas (Contreras, 2009). Según la clasificación de Lewis (1982) revisada por Young y Duncan (1994),

Para los flebotomos del Nuevo Mundo, la clasificación más aceptada es la mencionada anteriormente de Lewis (1982) y revisada por Young y Duncan (1994), en la que se establecen 3 géneros y 15 subgéneros. Debido a que esta clasificación presenta el problema de no revelar las relaciones evolutivas entre especies, se han realizado varias revisiones, que no han sido aceptadas universalmente. Las dos más recientes y comprensivas han sido realizadas por Galati, que en su segunda revisión engloba las 464 especies del Nuevo Mundo en 22 géneros y 20 subgéneros (WHO, 2010). Según la clasificación de Young y Duncan (1994), los flebotomos del Viejo Mundo se dividen en 3 géneros: *Phlebotomus* (12 subgéneros), *Sergentomyia* (8 subgéneros) y *Chinius*. Algunos autores han propuesto la elevación de algunos subgéneros a la categoría de género basándose en análisis fenéticos y cladísticos, como por ejemplo Rispail y Leger (1998) que propusieron la existencia de 7 géneros en el Viejo Mundo: *Phlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaeophlebotomus*, *Spelaeomyia* y *Chinius*.



S.D. Barón López (2014)

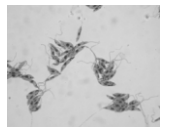


Aunque recientemente se ha sugerido la posible implicación de género *Sergentomyia* en la transmisión de *L. infantum* y *L. major* en Senegal y Malí respectivamente (Senghor et al 2011; Berdjane-Brouk et al 2012), los individuos de este género se consideran vectores de *Sauroleishmania*, grupo de *Leishmania* que solamente afecta a los lacértidos, por lo que en principio carecería de importancia en humanos (Lewis, 1982; Davidson 1990). El género *Chinius* está restringido a determinadas zonas de China y se piensa que se alimenta de anfibios y reptiles debido a que posee el labrum más corto dentro de los flebotomos (Leng, 1987). El género *Brumptomyia* se distribuye entre el sur de México y el norte de Argentina y se asocia normalmente con los armadillos, no habiéndose encontrado ninguna especie antropofílica, por lo que no presentan importancia médica (Young y Duncan, 1994). El género *Warileya*, aunque presenta un comportamiento zoofílico y antropofílico, no se ha encontrado relacionado con la transmisión de patógenos al hombre (Young y Duncan, 1994). Por esta razón se considera que los flebotomos vectores de la leishmaniosis humana, están englobados principalmente dentro de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (WHO, 2010).

1.7.2. Morfología general

Los flebotomos se caracterizan por presentar tanto el cuerpo como las alas densamente peludos. El cuerpo tiene aspecto giboso de entre 1'5-3'5 mm de longitud, con un color que va desde amarillento a casi negro, y con dos alas con múltiples nerviaciones y que en posición de reposo se disponen en un ángulo de 45 grados entre sí. El cuerpo se divide en cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza presenta un par de ojos compuestos y un aparato bucal picador-chupador (probóscide), y en el tórax presenta insertadas tres pares de patas largas y finas, al igual que las alas y los balancines o halterios (Gállego-Berenguer, 2006).

A continuación vamos a detallar cada una de las partes que constituyen su estructura general, basándonos principalmente en los estudios desarrollados por:



Perfiliev (1968), Abonnenc (1972), Morillas Márquez (1981), Léger y Depaquit (1999).



Figura 22. Hembra de flebotomo alimentándose. Imagen obtenida de www.elbercial.com.

1.7.2.1. Cabeza

La cabeza se encuentra constituida en su mayor parte por el epicráneo, estructura quitinosa capsular que se halla dividido en tres partes: occipucio, vértice y frente. La frente se extiende hasta el clípeo, donde se inserta la probóscide (aparato picador-chupador).

En ambos lados de la cabeza se sitúan dos grandes ojos compuestos, entre los que se localiza la sutura interocular y las primeras piezas de las antenas o escapes. Las antenas están formadas por la unión de un total de 16 segmentos (escape, pedicelo o torus, y 14 artejos que forman el flagellum; el primero de los artejos es el más largo). El escape presenta una forma más irregular mientras que el pedicelo (ó torus) tiene una forma normalmente ovoide. En el flagellum se pueden observar tanto sedas finas como ascoides (ó espinas geniculadas): elementos más gruesos, refringentes y acodados en su base, con función sensorial, y que pueden ser empleados con finalidad taxonómica. En los segmentos del flagellum de las antenas también se localizan unos órganos sensoriales particulares llamados papilas sensoriales.



Aparte de las estructuras mencionadas, en la cabeza también podemos localizar los palpos maxilares, que nacen en la base de las maxilas y están formados por 5 segmentos más o menos largos que suelen estar equipados con sedas cortas. Los dos primeros segmentos están soldados y en el tercer segmento (a veces también el segundo) se suele presentar una zona con pequeñas setas espatuladas refringentes e inclinadas en su base llamadas “espinas modificadas de Newstead”.

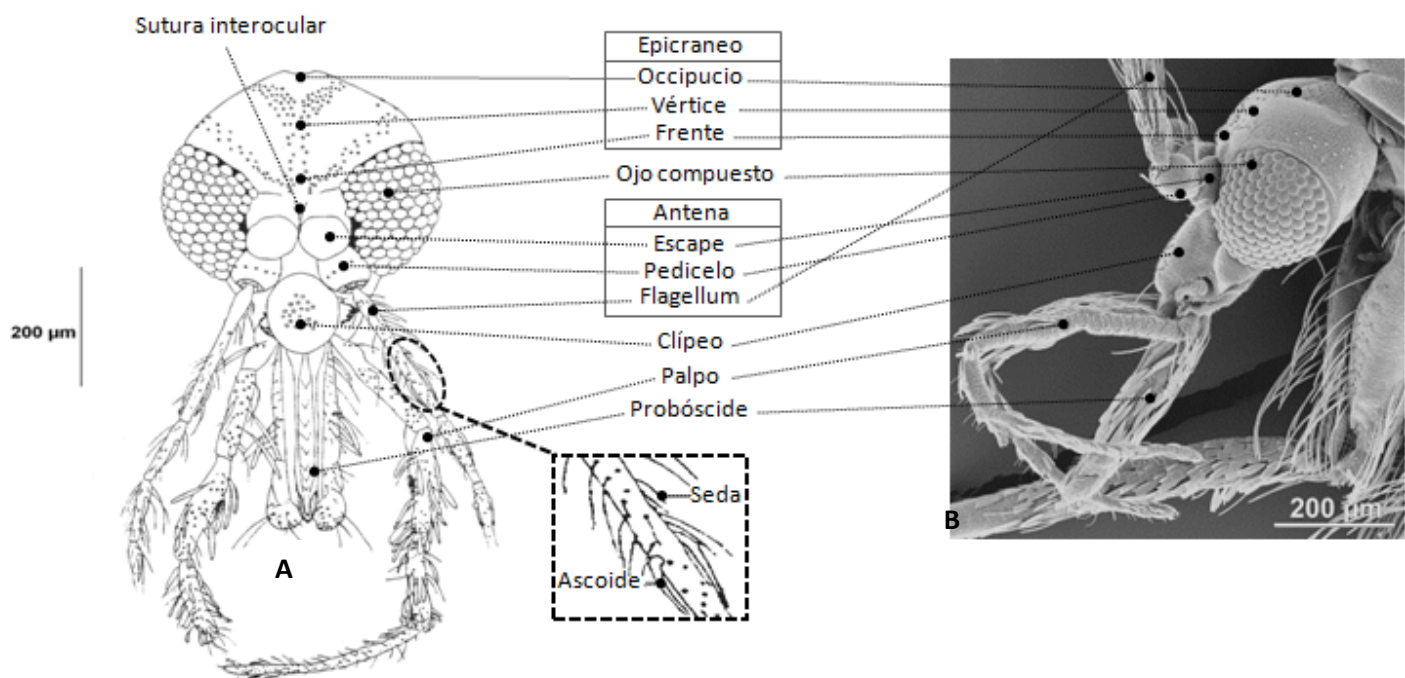
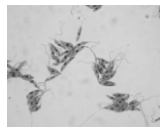


Figura 23. Cabeza de flebotomo: (A) Esquema de la cabeza tomada de Léger y Depaquit (1999); (B) Imagen a microscopía electrónica tomada de Krenn y Aspöck (2012). Modificadas por el autor.

La probóscide está constituida por 6 piezas bucales o estiletes, cuyo conjunto se denomina fascículo, que se hayan envueltas por el labium, que forma una vaina a su alrededor y es la estructura más voluminosa de la probóscide. La parte basal está constituida por una placa aproximadamente triangular llamada mentum. En el extremo del labium están las labelas (apéndices móviles formados por dos segmentos, cada uno con una placa quitinosa ventral sobre la que se insertan sedas, y cuyos bordes laterales se extienden sobre la superficie dorsal, donde se encuentran separados por una fisura interna membranosa). El segmento apical de las labelas está formado por una estructura globular más o menos libre. Las 6 piezas o estiletes que



forman parte de la probóscide son: labro-epifaringe, hipofaringe, 2 mandíbulas y 2 maxilas.

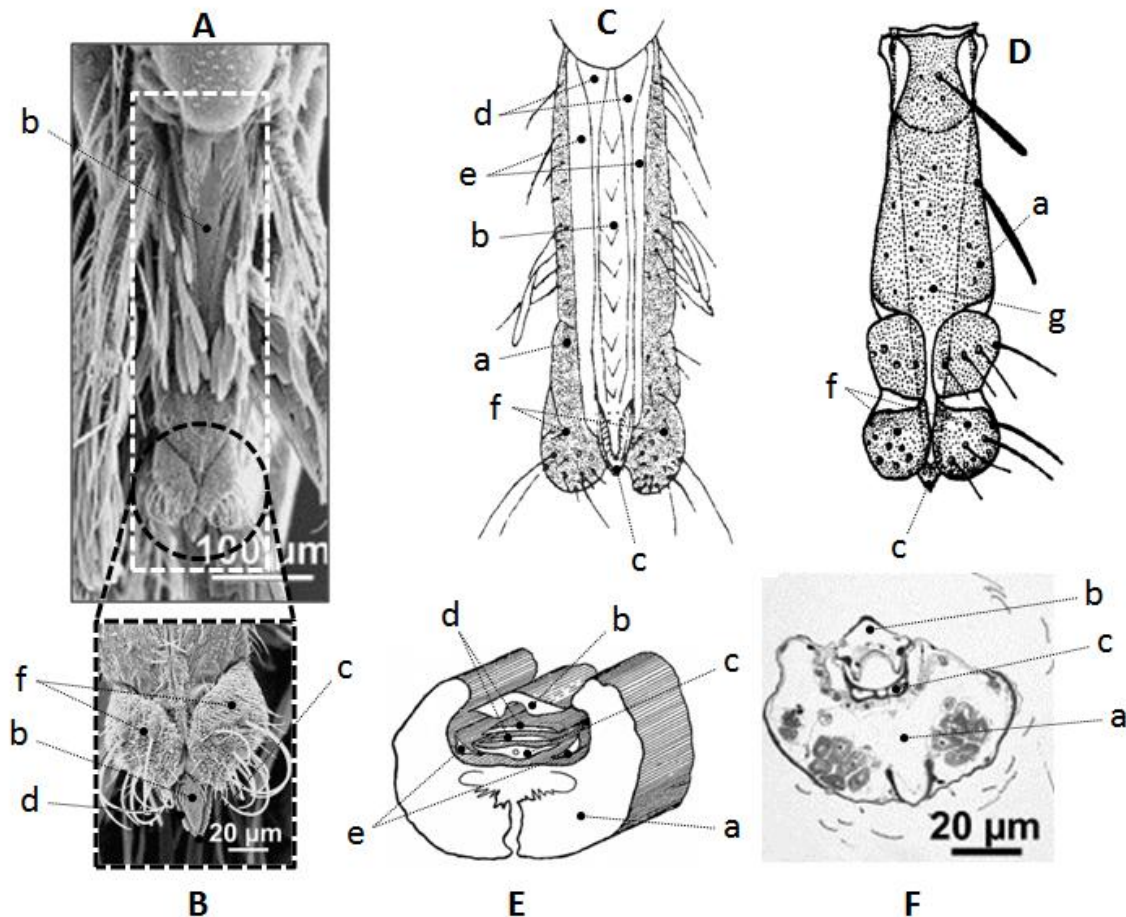


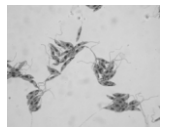
Figura 24. Detalle de la probóscide. En las distintas imágenes se muestra: (a) Labium, (b) Labro-epifaringe, (c) Hipofaringe, (d) Mandíbula, (e) Maxila, (f) Labela, y (g) Mentum. (A) imagen de la probóscide a microscopía electrónica, (B) Detalle del extremo apical de la probóscide a microscopía electrónica, (C) Esquema de la vista dorsal de la probóscide, (D) Esquema de la vista ventral de la probóscide, (E) Esquema del corte transversal de la probóscide, y (F) Corte transversal de la probóscide a microscopía electrónica. Imágenes obtenidas de Abonnenc (1972), Léger y Depaquit (1999), Krenn y Aspöck (2012). Modificadas por el autor.

- **Labro-epifaringe:** Está formada por el labro y la epifaringe (de ahí su nombre). El labro es una estructura muy quitinizada, alargada y relativamente ancha, formada por 3 placas (una media y dos laterales). La placa media es cóncava y constituye la mayor parte de la región dorsal del labro-epifaringe. Las partes laterales de la placa media se tornan en membranosas y la conectan con las placas laterales que son más estrechas y a veces forman varillas. La epifaringe forma un engrosamiento longitudinal al unirse con estas placas ventralmente, mediante membranas a las placas laterales y mediante fibras musculares a la



placa media. A lo largo de la epifaringe hay a intervalos, en cada uno de sus lados, pequeñas fosas sensoriales. Ventralmente el labro-epifaringe forma una cavidad longitudinal suficientemente profunda que termina dentro de la cavidad bucal. El labro-epifaringe de los machos está menos esclerotizada, las placas media y laterales forman una superficie más lisa, y las estructuras terminales de este labro-epifaringe son más pequeñas y suaves que en la hembra. La armadura de las partes inferiores están también menos desarrolladas en los machos.

- **Hipofaringe:** La hipofaringe es un tipo de lámina similar en longitud y anchura a la epifaringe que sigue a partir del suelo de la cavidad bucal. Su extremo terminal presenta en sus bordes dientes delgados y flexibles (razón por la cual se considera que no tiene función de perforación), y presenta en su zona media el canal salival que es netamente más delgado que el del Labro-epifaringe. En su porción anterior, a la altura del clípeo, se une al labro-epifaringe por su parte ventral, y en su extremo apical dentado está en contacto directo con las espinas apicales del labro, formando una especie de filtro. La hipofaringe de los machos es similar a la de las hembras, pero el margen apical presenta pelos gruesos en lugar de espinas o dientes.
- **Mandíbulas:** Cada mandíbula está formada por una lama larga y puntiaguda, y se disponen una sobre la otra. El extremo terminal presenta pequeñas denticulaciones en el borde interno, mientras que hacia la base de la mandíbula ésta se estrecha en un cuello bastante largo que termina en tuberosidades. Se distingue una protuberancia interna que se articula con el lateral de la cavidad bucal y donde se inserta el músculo aductor, una externa donde se inserta el abductor, y una media que actúa como superficie articular con el cóndilo mandibular. Los machos no tienen mandíbulas.
- **Maxilas:** De cada lado de la base del mentón, en el extremo anterior de la mejilla membranosa y continuando la línea de quitinización maxilar, se



encuentra la lamina maxilar o galea. Las maxilas son más gruesas y estrechas que las mandíbulas, y se disponen a ambos lados del canal labial. Al contrario que ocurría con las mandíbulas presentan denticulaciones en los dos bordes del extremo terminal; sin embargo la denticulación del borde interno está más marcada y no llega hasta el final de la estructura. De la base de las maxilas parten los palpos maxilares. Las maxilas de los machos son más cortas que en las hembras, y no están serradas.

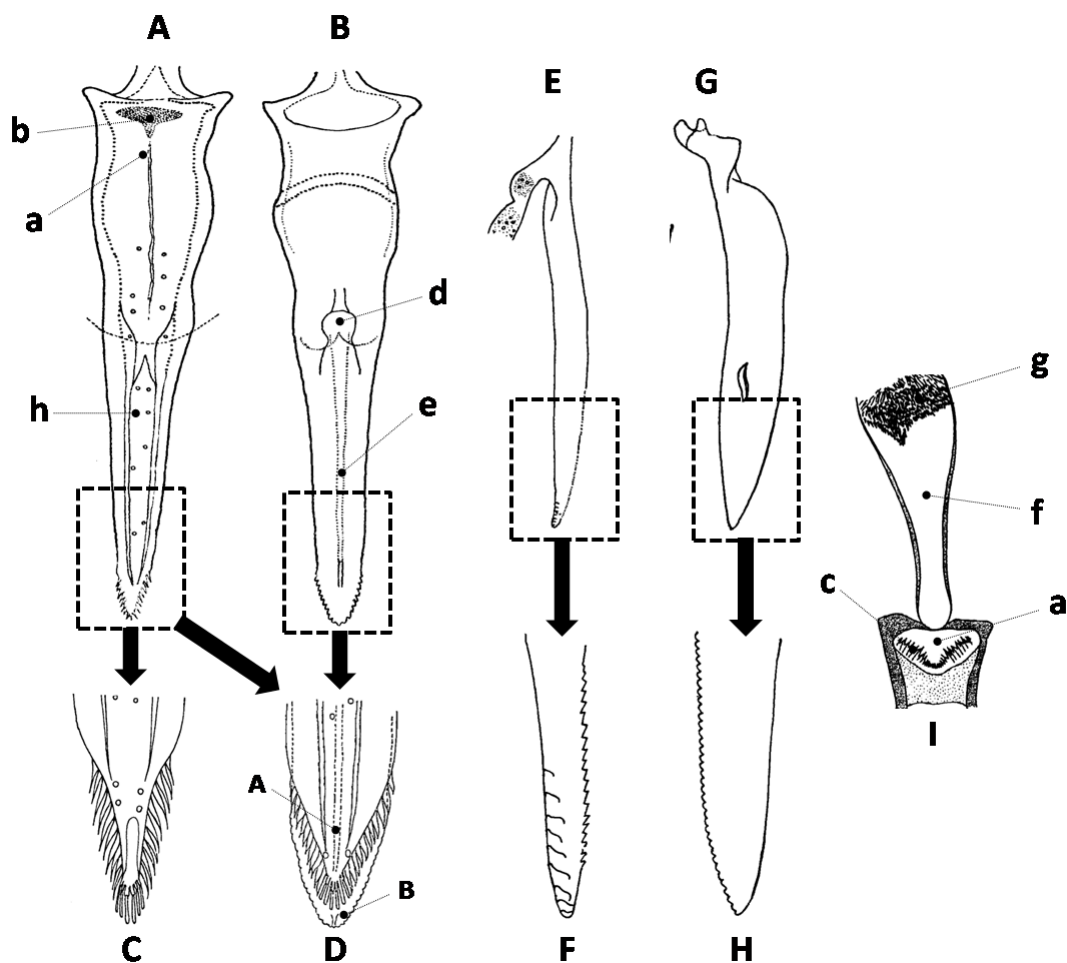


Figura 25. Estructuras del aparato bucal del flebotomo. (A) Labro-epifaringe, (B) Hipofaringe, (C) Detalle del extremo anterior de la Labro-epifaringe, (D) Detalle del extremo anterior de la unión Labro-epifaringe e Hipofaringe, (E) Maxila, (F) Detalle del extremo terminal de la maxila, (G) Mandíbula, (H) Detalle del extremo terminal de la mandíbula, (I) Unión de Cibarium y Faringe. Estructuras: (a) Cibarium, (b) Mancha cibarial, (c) Armadura cibarial, (d) Bomba salival, (e) Canal salival, (f) Faringe, (g) Armadura faríngea, y (h) Papila sensorial. Esquemas obtenidos de Abonnenc (1972), Léger y Depaquit (1999). Modificadas por el autor.

El **cibarium** es una estructura con gran capacidad succionadora situada dentro de la cabeza. A veces, en él aparece un engrosamiento en posición posterior conocido



como mancha pigmentaria, donde se pueden observar unos dientes más o menos desarrollados denominados dientes cibariales, de gran importancia taxonómica. A continuación se dispone la **faringe**, que está constituida por la unión de tres placas soldadas, dando lugar a una conformación parecida a una botella de sección triangular. En el extremo posterior de la faringe se ubica una estructura reticulada, llamada armadura faríngea. Tanto el cibarium como la faringe y su armadura faríngea son elementos que, dada su variabilidad morfológica, ostentan gran utilidad en taxonomía.

1.7.2.2. Tórax

La estructura del tórax presenta un aspecto giboso y se encuentra recubierto de pelos, con 6 patas en la zona ventral, y dorso-lateralmente dos alas y dos balancines o halterios. Está compuesto de 3 segmentos llamados: protórax, mesotórax y metatórax. De cada uno de estos segmentos salen por su zona ventral un par de patas de hasta tres veces la longitud corporal. El protórax es muy pequeño y parcialmente cubierto por el mesotórax, el cual se encuentra más desarrollado y presenta dos alas dorso-lateralmente. En el metatórax se distinguen los dos balancines (pequeños apéndices o estigmas de un segundo par de alas) cuya función es estabilizar el vuelo del flebotomo (Davis, 1967; Abonnenc, 1972; Morillas-Márquez, 1981).

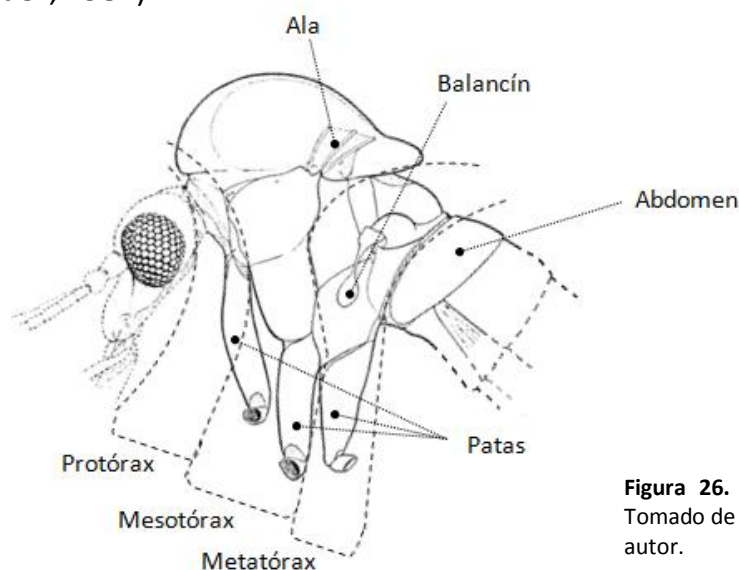
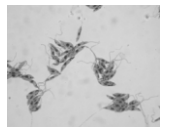


Figura 26. Esquema del tórax de un flebotomo. Tomado de Morales-Yuste (2012). Modificada por el autor.



Las alas se caracterizan por ser lanceoladas y muy pilosas, y por disponerse en un ángulo de 45 grados entre sí en posición de reposo. Presentan abundantes nerviaciones longitudinales y algunas transversas. La membrana del ala está salpicada de finos microtricos mientras que sus nerviaciones tienen sedas escamosas. Los parámetros taxonómicos empleados en estas estructuras como criterios de clasificación son las posiciones relativas de diversos puntos de confluencia de sus nerviaciones (Roiux y Golvan, 1969). Por lo tanto, las alas son las estructuras del tórax que presentan una mayor importancia desde el punto de vista sistemático. De arriba abajo del ala se distinguen las siguientes nerviaciones:

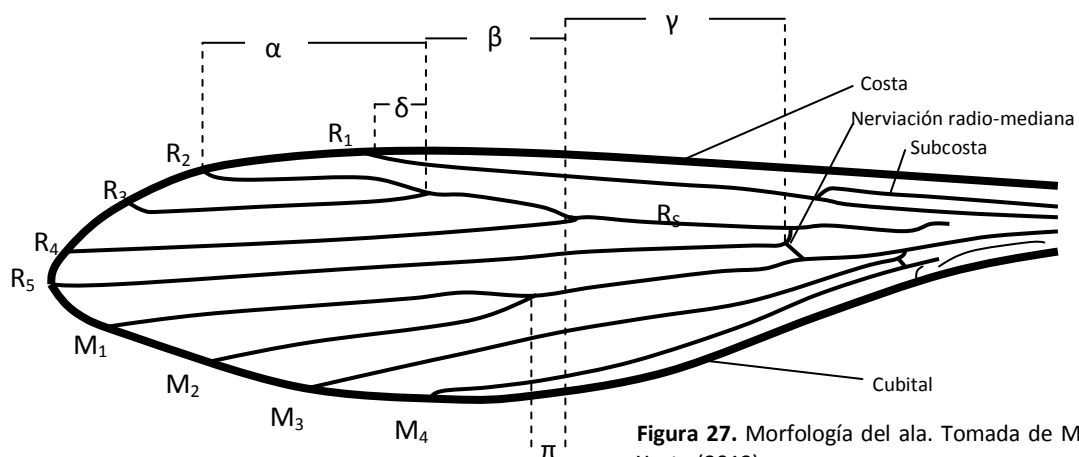


Figura 27. Morfología del ala. Tomada de Morales-Yuste (2012).

- La costal o costa que rodea el ala
- La subcostal, que es muy corta y se une a la 1ª Longitudinal cerca de su base.
- La 1ª Longitudinal simple: R_1 .
- La 2ª Longitudinal o sector radial (R_s), bifurcada dos veces y dando lugar a tres ramas: R_2 , R_3 y R_4 .
- La 3ª Longitudinal simple: R_5 .
- La 4ª Longitudinal, bifurcada y dando lugar a dos ramas: M_1 y M_2 .
- La 5ª Longitudinal simple: M_3 .
- La 6ª Longitudinal simple: M_4 .
- La 7ª Longitudinal simple o nervio "cubital".
- Los nervios transversales están muy cerca de la base del ala, y la más visible e importante es la transversal radio-mediana, que une la 2ª, 3ª y 4ª Longitudinal.



Los principales criterios de clasificación usados en las alas serían los valores α , β , γ y π que son distintas distancias entre bifurcaciones de las nerviaciones del ala (Figura 24).

Las patas son largas y delgadas, siendo las traseras las más largas. Cada una de ellas se divide en cadera o coxa, trocánter, fémur, tibia y tarso (compuesto por 5 segmentos). Otras características destacables que presentan las patas son que éstas terminan en dos uñas simples en el último segmento del tarso, que la tibia presenta una corona de sedas cerca de la articulación tibio-tarsiana, y que algunas especies tienen espinas cortas en el fémur.

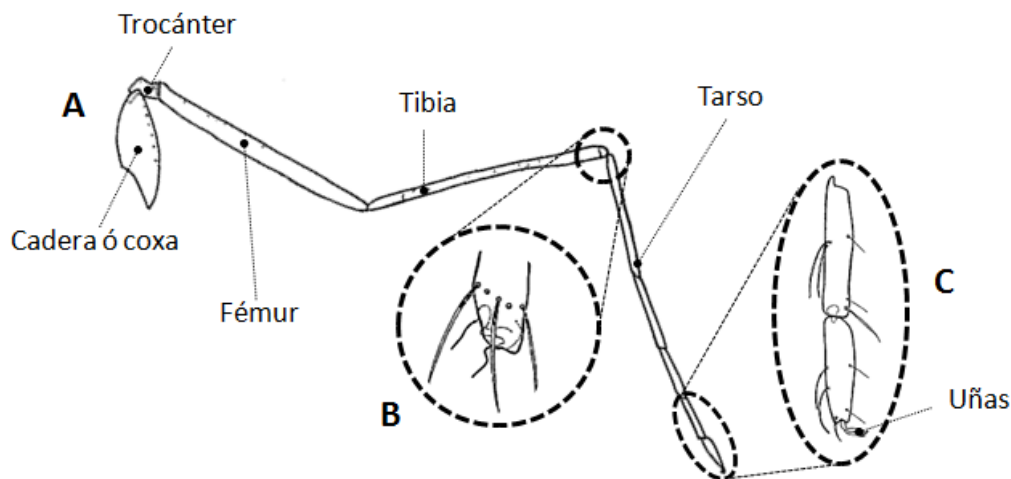
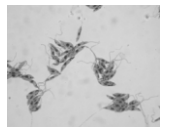


Figura 28. Esquema de la pata de un flebotomo. (A) Pata de flebotomo, (B) Detalle de la corona de sedas de la tibia, (C) Detalle de los dos últimos segmentos del tarso. Obtenida de Abonnenc (1972). Modificada por el autor.

1.7.2.3. Abdomen

El abdomen es en su mayor parte cilíndrico y está formado por la unión de 10 segmentos. Todos los segmentos que conforman el abdomen tienen una placa quitinosa llamada tergito en su parte dorsal, y otra llamada esternito en su parte ventral, menos desarrollada que el tergito. Ambas estructuras se encuentran separadas lateralmente por una superficie membranosa (membrana pleural) que permite la dilatación del abdomen en el momento de la alimentación. El primero de estos 10 segmentos se fija al tórax, y los dos últimos segmentos, muy modificados,



conforman el aparato genital externo (segmentos genitales). Los 7 segmentos no modificados restantes presentan cada uno un par de estigmas respiratorios, cuya apertura se encuentra generalmente en el borde anterior del segmento, sobre la membrana pleural más cerca del tergito que del esternito.

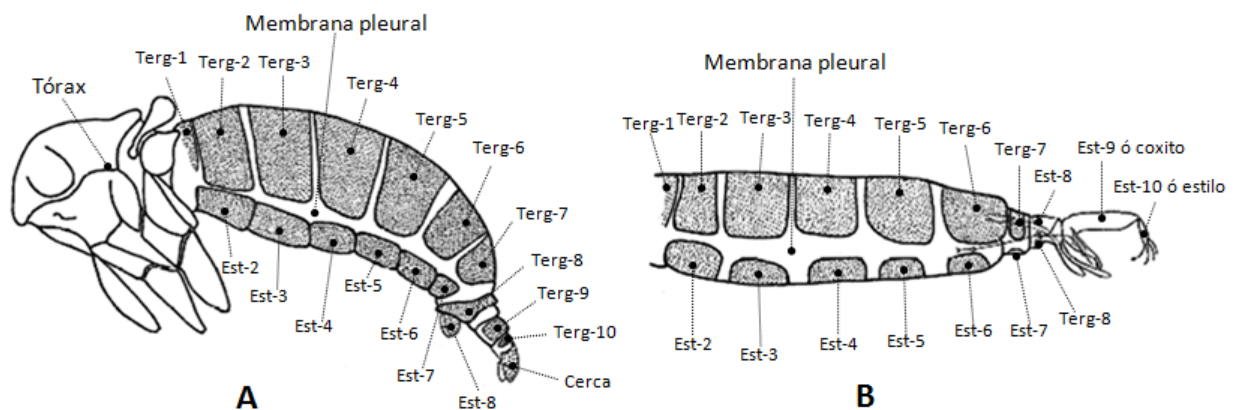


Figura 29. Esquema del abdomen de un flebotomo. (A) Abdomen de hembra, (B) Abdomen de macho, (Est) Esternito, (Terg) Tergito. Los números 1-10 indican el segmento al que pertenecen las distintas estructuras señaladas. Esquema obtenido de Abonnenc (1972). Modificado por el autor.

Principales características del abdomen de la hembra de flebotomo: En estado de reposo los segmentos del 8 al 10 se encuentran retraídos dentro del séptimo tergito y esternito, encontrándose extendidos únicamente durante la ovoposición, apareamiento y defecación (Davis, 1967). El 8º tergito está más desarrollado que los anteriores, y continúa en la región ventral con un esternito lobulado denominado gonapófisis ventral. A continuación se dispone el 9º tergito, bajo el cual se observa una región membranosa o área genital donde convergen los orificios de los conductos espermáticos de las espermatecas. Al último segmento abdominal se fijan dos placas laterales conocidas como cercas o gonapófisis dorsales, que se hallan separadas por una estructura quitinosa central que constituye el ano. Internamente el abdomen presenta 3 pares de órganos genitales: ovarios, glándulas anejas, y espermatecas. La **espermateca** se localiza en el interior de la parte terminal del abdomen, y en ella se diferencian la cabeza, cuello, cuerpo o reservorio y conductos espermáticos (Figura 27, B). En la práctica, uno de los elementos más utilizados para la clasificación de especies en la hembra es la espermateca.

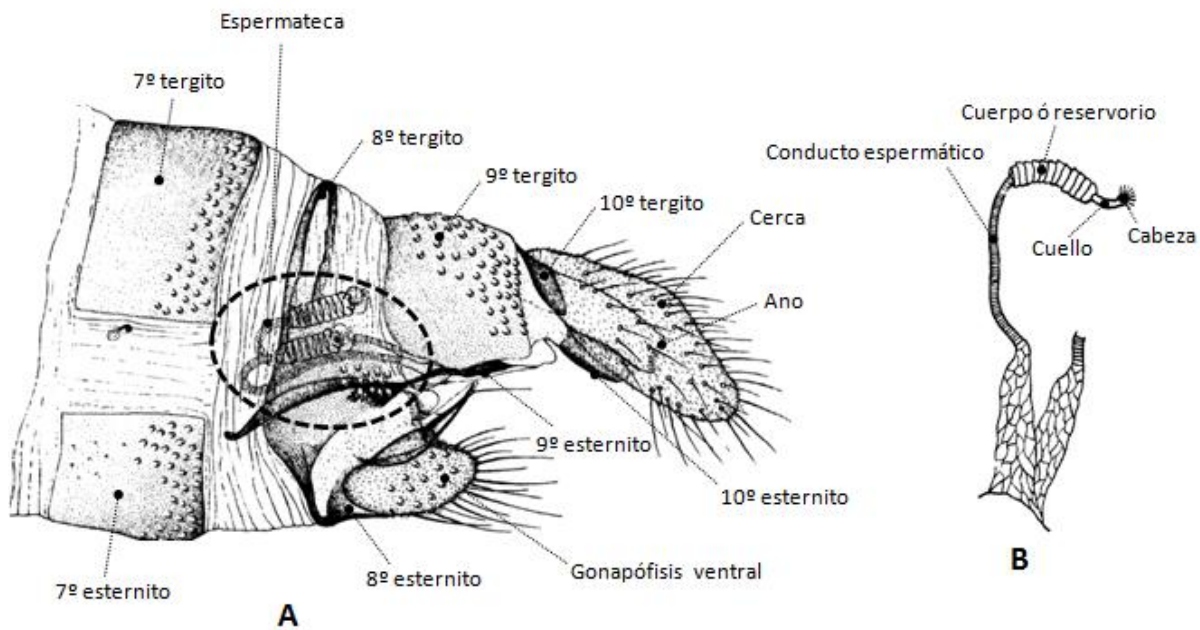
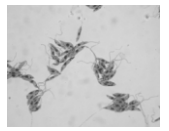


Figura 30. (A) Esquema del abdomen terminal de una hembra de *P. papatasi*. (B) Esquema de la espermateca de *P. ariasi*. Esquemas obtenidos de Theodor (1958) y Jobling (1987). Modificadas por el autor.

Principales características del abdomen del macho de flebotomo: En el macho los segmentos 7 y 8 se encuentran poco desarrollados, mientras que los segmentos terminales 9 y 10 se encuentran muy evolucionados y forman la armadura genital. Esta armadura genital, llamada también genitalia externa o terminalia, se divide principalmente en 3 pares de estructuras:

- Los coxitos, que son apéndices laterales alargados sobre los que se articulan los estilos. En los estilos hay espinas cuyo número, longitud y disposición pueden ser usados como criterios de clasificación específica.
- Los parámetros, que son piezas medianas que parten de la base de los coxitos. Entre los parámetros se observan unas estructuras fuertemente quitinizadas llamadas valvas peneanas o aedeagus. Estas valvas peneanas rodean al extremo terminal del filamento genital o canal eyaculador, cuyo extremo contrario conecta con la pompa genital, y ésta a su vez con el pistón.
- Los lóbulos laterales, que son prolongaciones ventrales soldadas a las cercas por su cara interna.



La genitalia del macho puede variar en su morfología dependiendo de la especie por lo que se usa normalmente como criterio de clasificación.

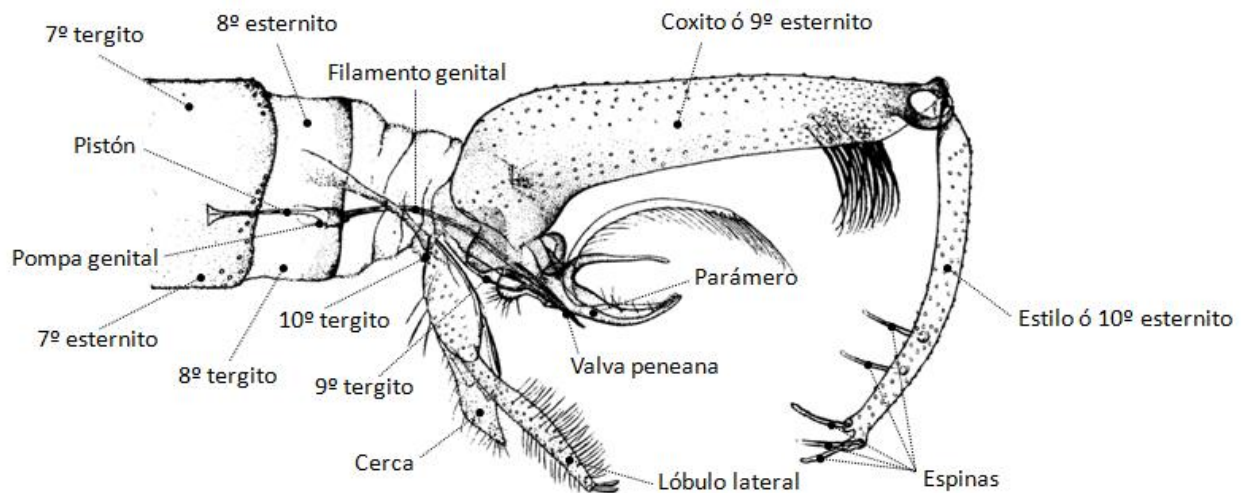


Figura 31. Esquema del abdomen terminal de un macho de *P. papatasi*. Esquemas obtenidos de Jobling (1987). Modificada por el autor.

1.7.3. Ciclo de vida y biología

La biología de cada especie de flebotomo es única y compleja, abarcando aspectos tales como la reproducción, alimentación, dispersión, y aspectos ecológicos del lugar donde viven.

En el ciclo de vida general que presentan estos dípteros, después de la eclosión del huevo se generan 4 estados larvarios distintos, seguidos de una fase de pupa, de la que finalmente emerge el adulto. Tanto el huevo, como las larvas y la pupa sufren su desarrollo en microhabitats ricos en materia orgánica, al contrario que otros dípteros que se desarrollan en ambientes acuáticos. Los periodos en los que se desarrollan las distintas fases son difíciles de determinar con exactitud, ya que se ven afectados por factores como la temperatura ambiente (temperaturas bajas alargan los tiempos mientras que temperaturas altas los acortan). En el laboratorio los huevos eclosionan generalmente sobre 7-10 días después de la ovoposición, mientras



que el desarrollo larvario antes de la pupación suele durar unas 3 semanas. La fase de pupación suele durar unos 10 días surgiendo el adulto tras este tiempo, siendo en su mayoría machos al principio. En la región Paleártica las distintas especies pueden hibernar mediante diapausa en el 4º estado larvario, mientras que en las zonas más cálidas y hábitats más húmedos, esta diapausa ocurre en el huevo. Las fases preimaginales son difíciles de encontrar en la naturaleza, y los lugares de cría de la mayoría de las especies se desconocen (WHO, 2010).

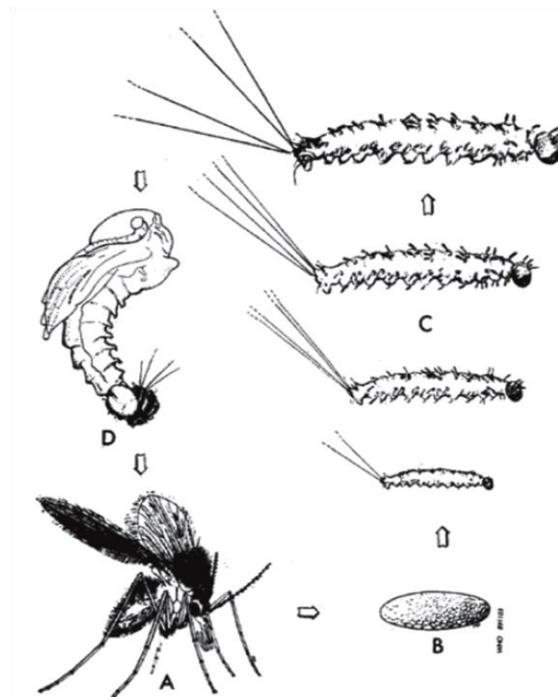
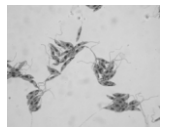


Figura 32. Ciclo de vida de flebotomo. (A) Adulto, (B) Huevo, (C) Fases larvarias, (D) Pupa. Obtenido de WHO (2010).

Killick-Kendick et al. (1977) obtuvieron que a 25°C, en el ciclo de *Lutzomyia longipalpis*, el tiempo transcurrido entre la alimentación de la hembra y la ovoposición era de 5-9 días, los huevos eclosionaban a los 4-9 días, el primer estadio larvario se mantenía durante 3-6 días, el 2º durante 2-4 días, el 3º durante 1-5 días, el 4º durante 3-9 días, y las pupas durante 10 días. Por lo tanto, la duración aproximada del ciclo desde que la hembra ingiere sangre hasta que emerge el adulto, es de 40 días. Sin embargo los valores que obtuvo Parrot (1931) sobre *Phlebotomus papatasi* fueron distintos, observando que la duración de su ciclo de vida variaba entre 40-72



días (Temperatura de 28°C), 47-92 días (Temperatura de 25°C) y 144-197 días (Temperatura de 22°C). En el centro de España, en un estudio similar realizado sobre ejemplares de *Phlebotomus perniciosus* cultivados a 28°C, el tiempo transcurrido entre la alimentación de la hembra y la ovoposición fue de 4-6 días, los huevos eclosionaban a los 4-6 días, el desarrollo larvario (desde la eclosión del huevo hasta la formación de la pupa) se realizaba en 14-23 días, y el desarrollo de las pupas en 7-11 días (Molina, 1991).

Los huevos se caracterizan por ser ovales con la cara dorsal convexa, de color blanquecino en el momento de la puesta para después oscurecerse, con un tamaño que oscila entre 300-400 μ de longitud y entre 100-150 μ de anchura, y un dibujo en la cubierta externa que puede variar de unas especies a otras. El número de huevos que una hembra puede depositar varía entre 30-80. Como ya hemos mencionado anteriormente, la temperatura puede afectar al desarrollo embrionario de manera que a la humedad adecuada y a una temperatura optima de entre 26-30°C, el huevo eclosiona en 6-7 días. La hembra ovoposita sobre un sustrato sólido de materia orgánica de composición variable y con una humedad adecuada (Ej: restos vegetales o desperdicios orgánicos). Estos huevos nunca se depositan sobre agua, aunque en inmersión pueden permanecer viables durante 5 días. Por el contrario, la desecación y la acción directa del sol si matan al huevo. El tiempo desde la alimentación de la hembra hasta la producción del huevo depende de la especie, velocidad de digestión y temperatura ambiente (Gil Collado et al., 1989; Killick-Kendrick, 1999).



Figura 33. Huevos de flebotomo. (A) Huevo de flebotomo (obtenida de www.europeana.eu), (B) Hembra grávida de *Sergentomyia minuta* (fotografía del autor).



Las larvas, al salir del huevo, son blanco-amarillentas y sólo están algo quitinizadas la cabeza y el último segmento abdominal. Su tamaño oscila entre 0'5-1 mm y posteriormente va aumentando, y se van quitinizando alcanzando un color casi negro. En su cuerpo se distingue un aparato bucal triturador, el tórax con sus segmentos fuertemente fusionados, y un abdomen con 9 segmentos. En el último segmento abdominal aparecen 1 o 2 pares de sedas largas y pigmentadas, y por todo el cuerpo se pueden apreciar también numerosos pelos y sedas de distintas formas y tamaños. Las larvas también se desarrollan en sustrato sólido compuesto principalmente por materia orgánica de la que se alimentan, dispuestas a distintas profundidades y con un grado de humedad suficiente. Las larvas de flebotomo sufren tres mudas, estando influenciado el paso de una a otra principalmente por la temperatura, tal y como se ha mencionado anteriormente (Gil Collado et al., 1989).

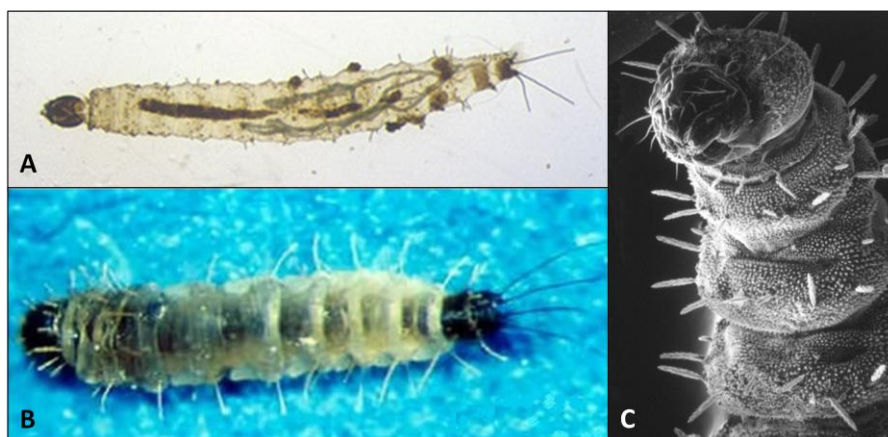
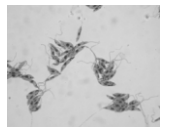


Figura 34. Larva de flebotomo. (A) Larva de *Phlebotomus perniciosus* (<http://jcastella.uab.cat>), (B) Larva IV de flebotomo (www.gruppoleishmania.org), (C) Larva de *Phlebotomus papatasi* a microscopía electrónica (<http://images.wellcome.ac.uk>).

Antes de sufrir la muda, el 4º estadio larvario se sitúa en la parte superior del sustrato en el que se localiza, y permanece inmóvil con la parte superior del cuerpo levantada durante algún tiempo. Posteriormente sufre la muda y sale la pupa quedando unida al sustrato por los segmentos posteriores, y a través de los dos últimos segmentos del abdomen a un resto de exuvia larvaria. La pupa tiene unos 3 mm de longitud y al principio es de color blanco-amarillento aunque después se ennegrece. Morfológicamente la cabeza se encuentra fusionada al tórax formando el



cefalotórax. En esta fase se aprecia que el abdomen está formado por 9 segmentos, el tórax por 3 segmentos, y en la cabeza la presencia de palpos, antenas, ojos y piezas bucales. También presenta numerosos pelos y sedas por todo el cuerpo (Gil Collado et al., 1989).



Figura 35. Pupa de flebotomo. (A) Pupa de *Lutzomyia shannoni* (<http://entnemdept.ufl.edu>), (B) Pupa de *Phlebotomus perniciosus* (<http://jcastella.uab.cat>).

De la fase de pupa surgen los adultos, que permanecen inmóviles durante 5-24 horas tras la eclosión, comenzando su actividad tras este periodo. El ciclo se cierra cuando las hembras maduran sus huevos y los ovopositan, debiendo ingerir sangre para asegurar dicha maduración (ciclo gonotrófico). Estos ciclos gonotróficos se dividen en tres fases principales: búsqueda del hospedador e ingestión de sangre, digestión y maduración de los huevos, y ovoposición. Las hembras realizan varios ciclos gonotróficos a lo largo de su vida, iniciando un nuevo ciclo después de cada ovoposición (Dolmatova y Demina, 1971).

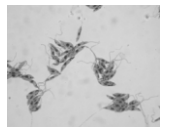
Por norma general, durante el día los adultos permanecen inmóviles en sus lugares de reposo que los mantienen reservados de la acción del viento y del exceso de luz, y les proporcionan una temperatura y humedad relativa adecuada. Estos lugares de reposo pueden estar alejados de la actividad humana (ej: huecos de troncos, grietas del terreno, barbacanas de muros de contención, madrigueras de



animales) o dentro de un ambiente doméstico. Estos dípteros presentan una actividad nocturna o crepuscular, por lo que desde la puesta del sol salen de sus lugares de reposo para alimentarse o para acoplarse machos y hembras. A altas horas de la madrugada vuelven a sus lugares de reposo, por norma general antes del amanecer. Aunque es rara su actividad diurna, es posible encontrarlos durante el día en habitaciones con escasa luz, aunque se trataría de una conducta excepcional. Para que el adulto desarrolle su actividad se han de producir unas determinadas características de temperatura y humedad, así como un viento inferior a 4 metros/segundo y ausencia de lluvias. Debido a sus particulares características de vuelo (a saltos o en pequeños vuelos, y una velocidad máxima de vuelo de 1 metro/segundo) el desplazamiento de los flebotomos está limitado a un máximo de 2 km, aunque lo más frecuente es que se desplacen unos pocos cientos de metros (Gil Collado et al., 1989; Killick-Kendrick, 1999).

Las hembras son las únicas con hábitos hematófagos, debido a que necesitan la sangre para la producción de los huevos. Éstas pueden alimentarse de cualquier vertebrado aunque suelen presentar una cierta predilección dependiendo de la especie de la que se trate. Este sería el caso de las especies antropófilas, las cuales es más frecuente encontrarlas en el interior de las viviendas humanas, y por lo tanto son las que presentan una mayor importancia sanitaria. Igualmente hay especies que únicamente se alimentan del hombre de manera excepcional y en ausencia de sus hospedadores normales, por lo que carecen de importancia sanitaria. Los machos se alimentan exclusivamente de productos azucarados vegetales, mientras que las hembras, además de la ingesta de sangre, se considera que un gran número de especies necesitan ingerir productos azucarados, y estos pueden tener una gran importancia para poder realizar la transmisión de *Leishmania* (Gil Collado et al., 1989; Rojas y Scorza, 1996; Killick-Kendrick, 1999).

Las distintas especies de flebotomos presentan variaciones poblacionales a lo largo del año, con distintos patrones dependiendo de la región geográfica en la que



se encuentren y de la especie de la que se trate. El estudio de las fluctuaciones poblacionales (fenología) presenta una gran importancia epidemiológica, ya que mediante este estudio se pueden averiguar tanto los periodos de actividad como las épocas de máxima población, y así poder determinar el periodo de mayor posibilidad de transmisión de *Leishmania*. Son varios los estudios fenológicos que se han realizado en la cuenca mediterránea desde hace bastantes años; por ejemplo: Rioux et al (1967) en el sur de Francia; Croset et al. (1970) en Túnez; Maroli y Bettini (1977) en Italia; y Morillas-Márquez et al. (1983), Martínez-Ortega (1985) y Sanchís Marín et al. (1986a) en el sur de la Península Ibérica. En España se ha podido observar que especies como *Sergentomyia minuta*, por norma general, presentan a lo largo del año una fenología monofásica (siendo coincidente con otras regiones mediterráneas), mientras que especies como *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi* y *P. papatasi* presentan una fenología difásica (Gil Collado et al., 1989). En un estudio realizado en el centro de España, Galvez et al. (2010) observaron que, efectivamente, *Phlebotomus perniciosus* presentaba una fenología difásica mientras que, a diferencia del estudio anterior, *Phlebotomus ariasi* presentaba una fenología monofásica, al igual que ocurre en el sur de Francia (Rioux et al., 1967).

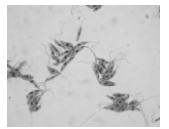
1.7.4. Correspondencia *Phlebotomus-Leishmania*

Como ya hemos mencionado, los vectores demostrados de la leishmaniosis son los flebotomos, pero no todas las especies de flebotomos pueden actuar como vectores, ni todas las especies vectoras son capaces de transmitir a todas las especies de *Leishmania*. De las aproximadamente 800 especies de flebotomo sólo 93 son vectores comprobados o probables de este protozoo, aunque periódicamente se van uniendo más especies a la lista. Por lo tanto existe una cierta especificidad zoológica entre *Leishmania* y el flebotomo, dónde cada especie de *Leishmania* posee un determinado espectro de vectores relativamente estrecho a nivel genérico y frecuentemente subgenérico. Sin embargo, esta especificidad puede no ser absoluta



debido a que especies de flebotomo normalmente no vectoras de una determinada especie de *Leishmania*, pueden actuar como tales. Dentro de las especies vectoras hay que diferenciar entre vectores específicos y vectores permisivos (Volf y Myskova, 2007). Los vectores específicos son aquellos que sólo pueden transmitir a una especie de *Leishmania* (ej. *Phlebotomus perniciosus* o *Phlebotomus ariasi* son vectores específicos de *Leishmania infantum*), mientras que los permisivos pueden transmitir a más de una especie (ej. *Lutzomyia youngi* es capaz de transmitir a *Leishmania garnhami* y a *Leishmania braziliensis*) (WHO, 2010). En la práctica habitual, el primer paso para incriminar a los vectores de una determinada especie de *Leishmania* es averiguar las especies que se alimentan de humanos en la misma región. Posteriormente se capturan estos posibles vectores y se diseccionan para intentar aislar al parásito y poder compararlo con las cepas aisladas de humanos (WHO, 2010). En la cuenca mediterránea las tres especies de *Leishmania* implicadas en los casos de leishmaniosis son *L. infantum* (transmitida por varias especies del subgénero *Larroussius*), *L. tropica* (transmitida principalmente por *P. (Paraphlebotomus) sergenti*) y *L. major* (transmitida por varias especies del subgénero *Phlebotomus* y *Paraphlebotomus*, principalmente por *P. (Phlebotomus) papatasi*). En España la única especie de *Leishmania* presente es *L. infantum*, pudiendo ser transmitida en esta región por tres especies del subgénero *Larroussius*: *P. perniciosus*, *P. ariasi* y *P. langeroni*, aunque sólo las dos primeras son vectores demostrados en nuestro país.

Las interacciones parásito-vector que controlan esta especificidad están relacionadas con las diferencias en la capacidad del parásito de inhibir o resistir a las enzimas proteolíticas secretadas durante la digestión de la sangre ingerida por el flebotomo, y/o con el mantenimiento de la infección en el intestino del flebotomo durante la defecación de la sangre digerida (Sacks, 2001). El mantenimiento de la infección en el intestino durante la defecación de la sangre digerida se considera que está relacionado con la unión mediada por lipofosfoglicanos (LPG) de *Leishmania* a la pared del intestino de sus flebotomos vectores. A su vez se ha visto que en los



	Especie de Leishmania	Género	Subgénero	Especie
Viejo Mundo	<i>L. donovani</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Paraphlebotomus</i> <i>Synphlebotomus</i>	<i>P. alexandri</i> * ¿? <i>P. martini</i> <i>P. celiae</i> <i>P. argentipes</i> <i>P. orientalis</i>
	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Larroussius</i>	<i>P. perniciosus</i> <i>P. ariasi</i> <i>P. perfiliewi</i> <i>P. langeroni</i> <i>P. neglectus</i> <i>P. longicuspis</i> <i>P. chinensis</i>
	<i>L. tropica</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Adlerius</i> <i>Paraphlebotomus</i>	<i>P. sergenti</i> * <i>P. saeveus</i> <i>P. arabicus</i>
	<i>L. aethiopica</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Larroussius</i>	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>
	<i>L. major</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>P. duboscqi</i> <i>P. papatasi</i> <i>P. salehi</i> <i>P. bergeroti</i> <i>P. caucasicus</i> <i>P. mongolensis</i> <i>P. ansarii</i>
	<i>L. killicki</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Paraphlebotomus</i> <i>Synphlebotomus</i> <i>Paraphlebotomus</i>	<i>P. sergenti</i> * <i>P. alexandri</i> * ¿? <i>P. chabaudi</i> ¿?
Nuevo Mundo	<i>L. chagasi/L. infantum</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i> <i>Pifanomyia</i> (Grupo Verrucarum)	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. Evansi</i>
	<i>L. mexicana</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Nyssomyia</i>	<i>Lu. olmeca olmeca</i> <i>Lu. diabolica</i> <i>Lu. shannoni</i> <i>Lu. ylephiletor</i> * <i>Lu. ayacuchensis</i>
	<i>L. amaranensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i> <i>Nyssomyia</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i> <i>Lu. olmeca nociva</i> <i>Lu. reducta</i>
	<i>L. venezuelensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Nyssomyia</i>	<i>Lu. olmeca bicolor</i>
	<i>L. pifanoi</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Nyssomyia</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i>
	<i>L. garnhami</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Pifanomyia</i> (Grupo Verrucarum)	<i>Lu. youngi</i> *
	<i>L. braziliensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Psychodopygus</i>	<i>Lu. carrerai</i> <i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. complexus</i> <i>Lu. intermedia</i> <i>Lu. whitmani</i> * <i>Lu. youngi</i> * <i>Lu. nuneztovari</i> * <i>Lu. ovallesi</i> <i>Lu. spinicrassa</i>
	<i>L. peruviana</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Helcocyrtomyia</i> <i>Pifanomyia</i> (Grupo Verrucarum)	<i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucarum</i>
	<i>L. guyanensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Nyssomyia</i>	<i>Lu. anduzei</i> <i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. whitmani</i> *
	<i>L. panamensis</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Nyssomyia</i> <i>Psychodopygus</i>	<i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. ylephiletor</i> * <i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. gomezi</i>
	<i>L. lainsoni</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Trichophoromyia</i> <i>Pifanomyia</i> (Grupo Verrucarum)	<i>Lu. ubiquitalis</i> <i>Lu. nuneztovari</i> *

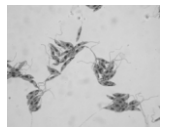
Tabla 1. Correspondencia *Leishmania*-Flebotomo en las leishmaniosis humanas. No se reflejan todas las especies vectoras, solo las confirmadas y/o algunas de las más probables. (*) Especies de flebotomo que transmiten a más de una especie de *Leishmania*. (¿?) Especies dudosas de actuar como vectores de una determinada especie de *Leishmania* a pesar de haberse relacionado (Killick-Kendrick, 1990; Bejarano et al., 2003; WHO, 2010; Ready, 2010; Boubidi et al., 2012).



vectores permisivos los mecanismos de adhesión a la pared del intestino son distintos e independientes a los LPG (Volf y Myskova, 2007). Aunque son varios los trabajos que mencionan esta correspondencia *Leishmania*-Flebotomo, la revisión realizada por Killick-Kendrick (1990) ha sido durante muchos años el trabajo de referencia en esta especificidad y ha sido actualizado por algunos autores en los últimos años (ej. Ready et al., 2010). En la Tabla 1 se presenta la correspondencia entre las principales especies de *Leishmania* y sus flebotomos vectores.

1.7.5. Biología del parásito en el vector

Hay una parte del ciclo biológico del parásito que ha de ocurrir en el interior de su flebotomo vector, y que está confinada al tracto digestivo de este díptero. El subgénero *Leishmania* presenta un ciclo suprapilórico, por lo que su desarrollo tiene lugar en el intestino medio, mientras que en el subgénero *Viannia* es peripilórico, por lo que los parásitos entran en el intestino posterior antes de migrar hacia delante por el intestino medio. También se ha comentado que el parásito pasa por distintas formas durante su estancia en este hospedador invertebrado, como son respectivamente: promastigote procíclico, nectomonas, leptomonas, haptomonas, y promastigote metacíclico (fase infectiva). Cada uno de estos estadíos se caracteriza por cambios morfológicos y funcionales destinados a garantizar la supervivencia en el flebotomo (Nieves y Rondon, 2007). Como ya hemos visto, el amastigote se transforma en promastigote procíclico, que son pequeños, lentos y con flagelo corto. Esta es una forma replicativa cuya principal función es la de aumentar la carga parasitaria mediante fisión binaria longitudinal (primer ciclo de multiplicación en el flebotomo), y suele aparecer a las 24-48 horas post-infección. Estas formas están presentes en la sangre temprana, que se encuentra rodeada por la membrana peritrófica Tipo I, y son relativamente resistentes al ataque de las enzimas digestivas. El pico de estas enzimas suele aparecer a las 18-48 horas después de la ingesta de sangre. Esta resistencia de *Leishmania* a las proteasas del intestino medio se



considera como el primero de los factores que determinan la competencia como vector de una determinada especie de flebotomo, ya que las enzimas crean un ambiente hostil para los parásitos. En una combinación compatible de *Leishmania*-flebotomo, durante el proceso de transformación de amastigote a promastigote procíclico, un 50% de los parásitos son destruidos por la acción de estas proteasas en los dos primeros días después de la ingesta de sangre, pero la matriz peritrófica proporciona el tiempo necesario para que el restante 50% se diferencie en la forma flagelada resistente. Además las especies de *Leishmania* han evolucionado para presentar estrategias que les permitan superar los efectos nocivos de las enzimas digestivas en vectores competentes, como son la inhibición o retardo del pico enzimático, o la secreción de neuropéptidos que inhiben los movimientos peristálticos del intestino medio y posterior, con el consiguiente beneficio para el mantenimiento de la infección (Kamhawi, 2006).

Los promastigotes procíclicos se transforman en nectomonas a las 48-72 horas post-infección, presentan una forma delgada y larga, y su principal función es la de escapar del confinamiento de la membrana peritrófica, anclarse en las células epiteliales que revisten el intestino medio, y migrar hacia el intestino medio torácico anterior. Aproximadamente a las 48 horas post-infección se produce un pico en la producción de quitinasas que conduce a la degradación de la membrana peritrófica entre las 48-72 horas post infección, siendo expulsada junto con la sangre no digerida. La acción de estas quitinasas parece ser que facilita la fuga de las nectomonas de la membrana peritrófica, ya que la inhibición de estas quitinasas (incluso en vectores competentes) produce una pérdida de parásitos debido a que no son capaces de escapar de la membrana peritrófica antes de la defecación. Además se ha comprobado que la superficie de las nectomonas presenta lipofosfoglicanos (LPG) que están implicados en su adhesión al intestino medio de los flebotomos. Esta adhesión mediada por LPG previene la pérdida de estas formas durante la excreción de la sangre, y es considerada como el mayor determinante de la competencia de

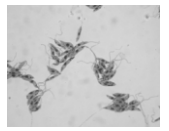


vectores para especies de *Leishmania*. Las leptomonas se forman a partir de las nectomonas a los 4-7 días post-infección, y al igual que los promastigotes procíclicos son formas proliferativas y sufren el segundo ciclo de multiplicación, resultando en una infección masiva del intestino medio anterior. Finalmente se observan dos formas que se suelen localizar en la valva estomodeal, las haptomonas y los promastigotes metacíclicos. El precursor de las haptomonas está todavía en discusión (nectomonas o leptomonas), y son formas especializadas estáticas que aparecen a los 5-7 días post-infección. Estas formas haptomonas se encuentran unidas al revestimiento cuticular de la válvula estomodeal formando círculos concéntricos que tapan la apertura de la válvula. A su vez, producen quitinasas que son responsables de la degeneración del revestimiento quitinoso de la válvula estomodeal. La degeneración perjudica la alimentación del flebotomo produciendo mayores y más frecuentes procesos de alimentación, lo que contribuye a un incremento de la eficiencia de transmisión del parásito (Kamhawi, 2006; Bates, 2007; Maia et al., 2011; Dastàlová y Volf, 2012).

Los promastigotes metacíclicos son la forma infectiva y está altamente adaptada para la transmisión al hospedador vertebrado. Estos promastigotes se forman a partir de las leptomonas a los 5-7 días post-infección, no sufren división y se acumulan en la válvula estomodeal asegurando la disponibilidad de un gran número de parásitos para su transmisión. La degeneración de la válvula estomodeal producida por las haptomonas permite que algunos promastigotes metacíclicos la atraviesen y ocupen distintas partes anteriores del flebotomo como son las glándulas salivares, faringe y probóscide del vector, lo que facilita su posible inoculación en el hospedador vertebrado.

1.7.6. Control del vector

El control de la leishmaniosis presenta una gran complicación debido a la gran cantidad de factores involucrados que afectan tanto a vectores, parásitos y



reservorios. En la actualidad se le da una mayor prioridad al control de los vectores que al control de los reservorios, pretendiendo reducir o interrumpir la transmisión de la infección, y siendo más eficaz y mejor visto por la sociedad que por ejemplo el sacrificio de perros infectados (reservorios). Debido a que todavía no se tiene un buen conocimiento de los lugares de cría de los flebotomos, la mayoría de las medidas de control van dirigidas a los adultos y no a las fases preimaginales. Actualmente no hay muchos estudios bien controlados de intervención sobre los adultos, por lo que las evaluaciones de eficacia y coste-beneficio son difíciles de realizar, y además los resultados de las distintas intervenciones contra el vector raramente son comparados. Entre estos métodos se citan: destrucción del hábitat natural de los flebotomos, pulverización de insecticidas en casas y refugios de animales, pulverización de insecticidas en la vegetación circundante como barrera de protección, uso de mosquiteras y cortinas tratadas con insecticidas, tratamiento con insecticidas en los lugares de reposo y alimentación de los flebotomos, repelentes químicos como por ejemplo los collares de perro impregnados o los usados en viviendas humanas, y otras alternativas como son el uso de bacterias y hongos (control biológico), el uso de plantas que tienen una acción tóxica en estos dípteros, o el uso de feromonas como atrayente hacia superficies tratadas con insecticida (Killick-Kendrick, 1999; Alexander y Maroli, 2003; Quinnell y Courtenay, 2009; WHO 2010).

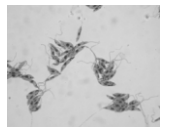
Una forma habitual de control es la destrucción total del hábitat natural seguida de una reordenación del terreno para asegurarse que las condiciones adecuadas para la proliferación de estos dípteros no se vuelven a producir. Este método se ha usado por ejemplo en el centro de Asia, en las repúblicas de la antigua Unión Soviética, o en el Neotrópico, donde la realización de deforestaciones ha dado lugar a la desaparición de especies de flebotomos silvestres (ej: *Lu. umbratilis* y *Lu. yuilli pajoti* en Bolivia). En determinadas circunstancias la modificación de ciertos ambientes puede sustituir a la destrucción y ser igualmente efectiva. En este sentido, en ciertos programas de control de *P. argentipes* en la India se realizó un emplastado



de los muros de casas y cobertizos con una mezcla de barro y cal, sellando de esta manera los lugares de reposo de los flebotomos, y produciendo una fuerte caída de la población comparado con los lugares no emplastados. La destrucción de estos microhabitats donde residen los flebotomos representa uno de los pocos ejemplos de control sin aplicación de insecticidas (Killick-Kendrick, 1999; Alexander y Maroli, 2003).

En la década de los 50 y 60 del siglo pasado, se realizaron campañas de erradicación de la malaria mediante fumigación de grandes extensiones de terreno con DDT. Estas fumigaciones produjeron una caída drástica de la prevalencia de la leishmaniosis, aunque después de dejar de utilizarse este insecticida se volvió a los niveles anteriores a las campañas antipalúdicas. En las áreas donde las zonas de cría de los flebotomos son conocidas, también se suele usar el tratamiento con insecticidas en estas zonas y en los lugares de reposo, siendo la forma más usual para el control de especies que rara vez entran en las viviendas humanas (especies selváticas). Estos métodos menos drásticos, como son el uso de insecticidas en madrigueras de posibles reservorios, han tenido un éxito dispar dependiendo de la especie de flebotomo sobre la que se ha realizado y del insecticida de elección. El problema que presenta la aplicación de insecticidas es que por razones de impacto ambiental no se permite su uso prolongado (Killick-Kendrick, 1999; Alexander y Maroli, 2003; Quinnell y Courtenay, 2009).

También es frecuente el rociado con insecticidas en las casas o en la vegetación circundante a las viviendas, con el fin de controlar a las especies de flebotomo peridomésticas, aunque la reducción del número de flebotomos puede ser de corta duración. Otro método profiláctico frente a especies peridomésticas es el uso de mosquiteras en las camas, frecuentemente impregnadas con insecticidas. El principal problema que presenta este método es que el pico de actividad de estos dípteros es poco después de la puesta del sol antes de que las personas estén en la cama, por lo que pueden tener poco efecto en la transmisión a personas. Como



alternativa se han usado cortinas impregnadas con insecticida, aunque los resultados han sido dispares dependiendo del lugar de aplicación y la especie. Por ejemplo en Colombia las cortinas con deltametrina fueron menos eficaces que las mosquiteras mientras que en Italia y Burkina Faso las cortinas con permetrina redujeron a los flebotomos endofílicos un 90% y un 99% respectivamente. (Killick-Kendrick, 1999; Alexander y Maroli, 2003; Quinnell y Courtenay, 2009).

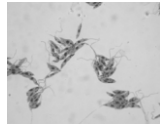
Otro método de control es mediante el uso en personas de repelentes químicos, aunque se trata un método bastante caro y no se recomienda su uso prolongado. Se trata más bien de un método de elección en individuos que van a estar en zonas de riesgo durante un tiempo limitado (turistas, soldados, cazadores, etc...). Otro tipo de repelentes químicos son las típicas pastillas o frascos antimosquitos que se conectan a la corriente eléctrica, y que son muy baratos y eficaces frente a los flebotomos. En cuanto a la prevención contra la picadura de estos dípteros en animales de compañía que pueden actuar de reservorio, como es el perro, habitualmente se usan collares impregnados con deltametrina (Scalibor®) que ofrece una protección contra las picaduras de hasta el 94% durante 34 semanas. También se han probado los lavados con deltametrina, llegando a matar hasta el 50% de *P. chinensis* que se alimentan del perro durante 70 días, aunque no se detectó efecto sobre la alimentación del flebotomo. Se consideran como métodos de profilaxis frente al vector, que junto con los collares con deltametrina, los perros duerman en el interior de las casas durante las principales horas de actividad de los flebotomos (Killick-Kendrick, 1999; Alexander y Maroli, 2003; Quinnell y Courtenay, 2009). Recientemente se ha puesto a punto la pintura Inesfly®, que incorpora en su composición diversos insecticidas, y se usa para pintar casas, sótanos, granjas, cuadras, etc. Se utiliza para combatir a los triatominos (Amelotti et al., 2009), y ha mostrado eficacia contra un importante número de artrópodos, entre ellos *Anopheles* (Mosqueira et al., 2010a; Mosqueira et al., 2010b). También está indicada para uso ganadero contra los flebotomos, en cuyo caso los insecticidas usados son α -



cipermetrina, tetrametrina y diflubenzurón, bajo el nombre comercial “INESFLY IGR VET PYR” (www.disprovet.com/en/attachment.php?id_attachment=21).

Como métodos alternativos al uso de insecticidas para el control de los flebotomos se han usado bacterias, hongos, y plantas que tienen una acción tóxica en estos dípteros. Se ha visto que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *Bacillus sphaericus* son letales para las fases preimaginales de los flebotomos. El problema que presenta este método es que todavía se sabe poco de los lugares de cría de la mayoría de las especies. Se ha visto que es posible el uso de estas bacterias en adultos mediante la impregnación de plantas con una mezcla de estos organismos y azúcares (Alexander y Maroli, 2003). Otro entomopatógeno que se ha usado es el hongo *Beauveria bassiana*. De entre las plantas que presentan una acción tóxica frente a los flebotomos podemos mencionar *Bougainvillea glabra*, *Ricinus communis* y *Solanus jasminoides* entre otras, y representan una alternativa sostenible y barata al uso de insecticidas para crear zonas de barrera para el control de los flebotomos y de la leishmaniosis. También se ha observado que las avermectinas en bajas concentraciones son capaces de matar a los flebotomos, y dosis subletales en sangre reducen la esperanza de vida y fecundidad de las hembras adultas (Alexander y Maroli, 2003). Las avermectinas son derivados macrocíclicos de la lactona que se generan como productos de la fermentación de *Streptomyces avermitilis* y presentan propiedades insecticidas, acaricidas y antihelmínticas. Otro método alternativo sería el uso de feromonas como atrayente hacia superficies tratadas con insecticida (Alexander y Maroli, 2003).

Como se puede observar son varios los métodos que se pueden utilizar, pero el uso de uno u otro va a variar dependiendo de la especie de flebotomo involucrada y otros factores epidemiológicos propios de cada especie, por lo que se ha de tener en cuenta: si se trata de una especie zoofílica o antropofílica, si su alimentación se realiza alrededor de las casas o en zonas extradomiciliarias, si la transmisión del parásito es estacional o anual, etc...



1.7.7. Principales especies presentes en España

Desde que Lauffer capturara en El Escorial (Madrid) a los primeros ejemplares de flebotomo (Czerny y Strobl, 1909) hasta la actualidad, se han realizado numerosos estudios que han permitido identificar a las distintas especies presentes en España, su distribución y su abundancia. A lo largo de los años se ha podido comprobar que en total hay 11 especies de flebotomos presentes en nuestro país pertenecientes a dos géneros: *Sergentomyia* y *Phlebotomus*. Dentro del género *Sergentomyia* están las especies *S. minuta* y *S. fallax* pertenecientes al subgénero *Sergentomyia*. En el género *Phlebotomus* se diferencian 5 subgéneros que agrupan a las 9 especies restantes: *Phlebotomus* (*P. papatasi*), *Larrousius* (*P. perniciosus*, *P. ariasi* y *P. langeroni*), *Paraphlebotomus* (*P. sergenti*, *P. alexandri* y *P. chabaudi*), *Adlerius* (*P. mascittii*), y *Abonnencius* (*P. fortunatarum*).

Cabe destacar que aunque en un principio se mencionaba también la presencia de la especie *P. longicuspis*, distintos estudios moleculares indican que estos individuos son en realidad *P. perniciosus* con una modificación en sus valvas peneanas. El principal motivo para esta consideración es que los individuos españoles de ambas especies no se pueden diferenciar genéticamente, presentando únicamente diferencias en la morfología de sus valvas peneanas (Martín-Sánchez et al., 2000; Pesson et al., 2004).

1.7.7.1. Distribución de las especies españolas

Gil-Collado et al. (1989) realizaron una revisión de la distribución, morfología y biología de los flebotomos en España. Según estos autores las especies citadas desde principios de siglo (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *S. minuta*) se encontraban distribuidas en la mayor parte del país, siendo inferior su presencia en la zona cantábrica. También mencionaron la presencia de tres especies típicamente africanas en el sudeste peninsular (*P. alexandri*, *P. chabaudi* y *P. longicuspis*; esta

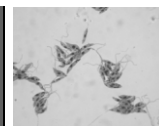


última considerada actualmente como *P. perniciosus*), en Cataluña *P. mascittii*, y en las Islas Canarias *S. fallax* y *P. fortunatarum* (especie exclusiva de esta región). Posteriormente, Gállego-Berenguer et al. (1992) actualizaron estos datos de distribución de los flebotomos en el noreste peninsular, Ávila y Baleares.



Género <i>Phlebotomus</i> Rondani, 1843	Subgénero <i>Phlebotomus</i> Rondani, 1843 ● <i>P. papatasi</i> Scopoli, 1786 Subgénero <i>Larroussius</i> Nitzulescu, 1931 ■ <i>P. ariasi</i> Tonnoir, 1921 ● <i>P. perniciosus</i> Newstead, 1911 ▣ <i>P. langeroni</i> (Nitzulescu, 1930) Subgénero <i>Adlerius</i> Nitzulescu, 1931 ✱ <i>P. mascittii</i> Grassi, 1908	Subgénero <i>Paraphlebotomus</i> Theodor, 1948 ★ <i>P. alexandri</i> Sinton, 1928 ☆ <i>P. chabaudi</i> Croset, Abonnenc y Rioux, 1970 □ <i>P. sergenti</i> Parrot, 1917 Subgénero <i>Abonnencius</i> Morillas Márquez et al., 1984 ⊠ <i>P. fortunatarum</i> Úbeda-Ontiveros et al., 1982
	Género <i>Sergentomyia</i> Franca et Parrot, 1921 ○ <i>S. minuta</i> (Rondani, 1843) ⊗ <i>S. fallax</i> (Parrot, 1921)	

Figura 36. Distribución de las especies de flebotomo presentes en España (Morales-Yuste, 2012). Figura basada en datos de Gil-Collado et al. (1989), Gállego-Berenguer et al. (1992), Lucientes et al. (1994), Martínez-Ortega et al. (1996), Conesa-Gállego et al. (1997), León-Sanz et al. (1999), Lucientes et al. (2001) y Aransay et al. (2004). Modificada por el autor.



Desde la revisión realizada por Gállego Berenguer et al. (1992) hasta la actualidad tan solo se ha descrito una especie más, *P. langeroni*. Esta especie ha sido capturada en Madrid (Martínez-Ortega et al., 1996; Conesa-Gállego et al., 1997) y Zaragoza (Lucientes et al., 1994; Lucientes et al., 2001). También se han registrado nuevas localizaciones de *P. papatasi* en Valencia y Guadalajara mediante la revisión de especímenes capturados por Nájera (León-Sanz et al., 1999). A su vez, se ha notificado la presencia de las especies *P. papatasi* y *P. sergenti* en La Rioja, y *P. ariasi* como única especie identificada en el norte de la provincia de Álava (Aransay et al., 2004).

1.7.7.2. Características morfológicas principales de las especies españolas

Como ya se ha mencionado anteriormente en España hay 11 especies de flebotomos distribuidas en dos géneros y 6 subgéneros. A continuación se van a detallar las principales características morfológicas que sirven para diferenciar los distintos géneros, subgéneros y especies presentes en nuestro país. La descripción de estas características y las figuras (modificadas por el autor), se han obtenido de Guevara-Benítez et al. (1978), Morillas-Márquez (1981), Morillas-Márquez et al. (1984), Sanchis-Marín (1986), Martínez-Ortega y Conesa-Gallego (1987b), Gil-Collado et al. (1989), Gállego-Berenguer et al. (1992), Lucientes et al. (1994), Martínez-Ortega et al. (1996), Guerbouj et al. (2007), Morales-Yuste (2012), y fotografías del autor.

Género *Sergentomyia*; Subgénero *Sergentomyia* Franca y Parrot, 1921

Las especies pertenecientes al género *Sergentomyia* presentan una peculiaridad en la 2ª nerviación longitudinal de las alas, donde $\alpha < \beta$, mientras que en las especies del género *Phlebotomus* $\alpha > \beta$ (Figura 37). En las hembras del subgénero *Sergentomyia*, el cibarium está armado con dientes dispuestos en fila recta y el reservorio de la espermoteca es liso. En el macho, el estilo presenta 4 espinas, todas terminales o subterminales, y 1 seda “no caduca”.

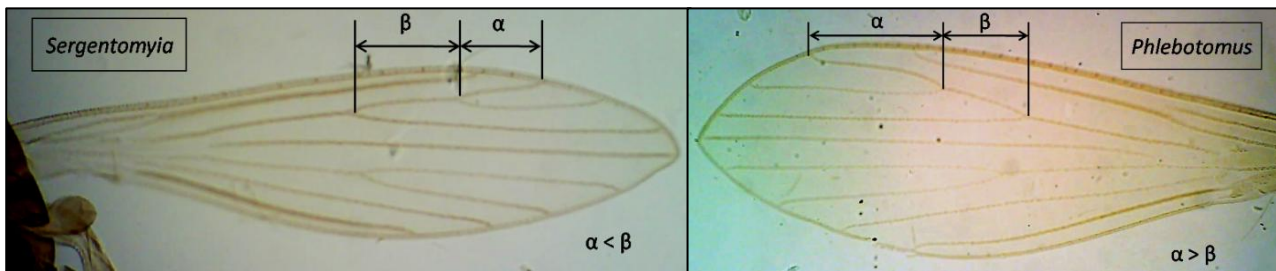


Figura 37. Alas de los géneros *Sergentomyia* y *Phlebotomus* (Fotografías del autor).

***S. minuta* (Rondani, 1843).**

Hembra: El cibarium está armado con 20-85 dientes ligeramente incurvados hacia atrás formando una empalizada compacta, y presenta una mancha pigmentaria marcada (Figura 38, A). La espermateca tiene forma de tubo con la cabeza invaginada, similar a la descrita en *S. fallax* (Figura 38, B), y sensiblemente diferente a las espermatecas del género *Phlebotomus*.

Macho: Se distinguen cuatro espinas situadas en porción terminal y sub-terminal del estilo, y una seda no caduca entre el tercio medio y distal (Figura 38, C). El cibarium tiene 20 dientes de morfología y tamaño variable, dispuestos en un pequeño arco cóncavo (Figura 38, D). Las valvas peneanas presentan una forma de “dedo de guante” característica (Figura 45, A).

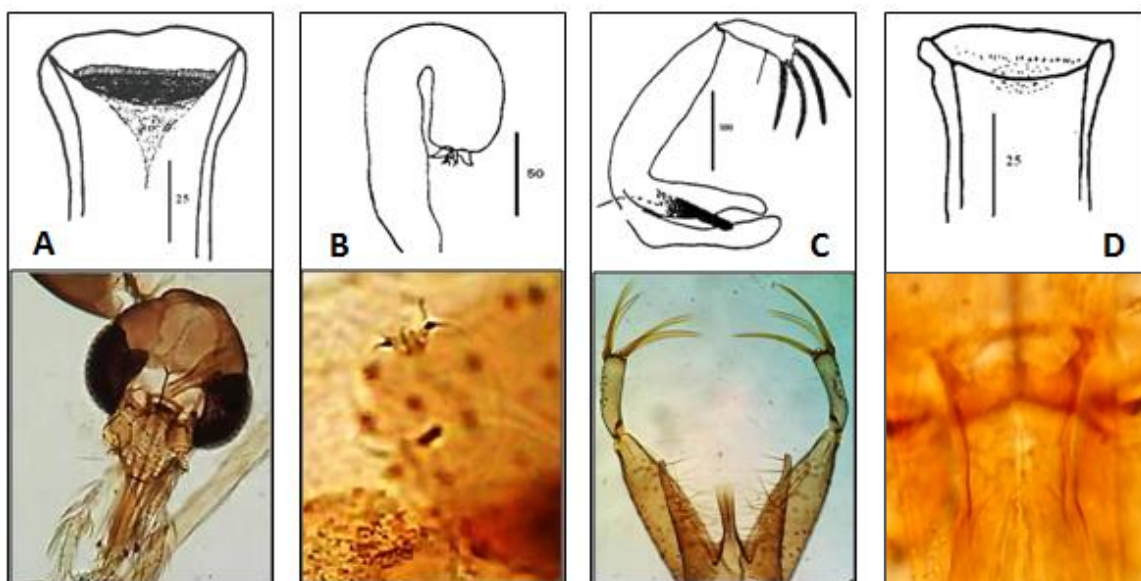
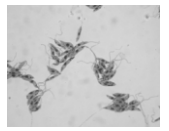


Figura 38. Características taxonómicas de *S. minuta*. (A) Cibarium hembra, (B) Espermateca hembra, (C) Cibarium macho, (D) Genitalia externa macho.



***S. fallax* (Parrot, 1921).**

Hembra: El cibarium está armado con unos 20 dientes agudos, monomorfos y formando un arco cóncavo hacia atrás. La faringe presenta una forma acorazonada, donde se observan una serie de dientes polimórficos (Figura 39, A). La espermateca es similar a *S. minuta* (Figura 39, B).

Macho: El cibarium tiene 17 dientes agudos, monomorfos y dispuestos en arco cóncavo hacia atrás, y una mancha pigmentaria oscura, oval y con bordes regulares (Figura 39, C). El estilo es largo, con 4 espinas terminales y una seda no caduca terminal más pequeña que la de *S. minuta* (Figura 39, D). Valvas del pene ligeramente incurvadas en el borde superior (Figura 45, A).

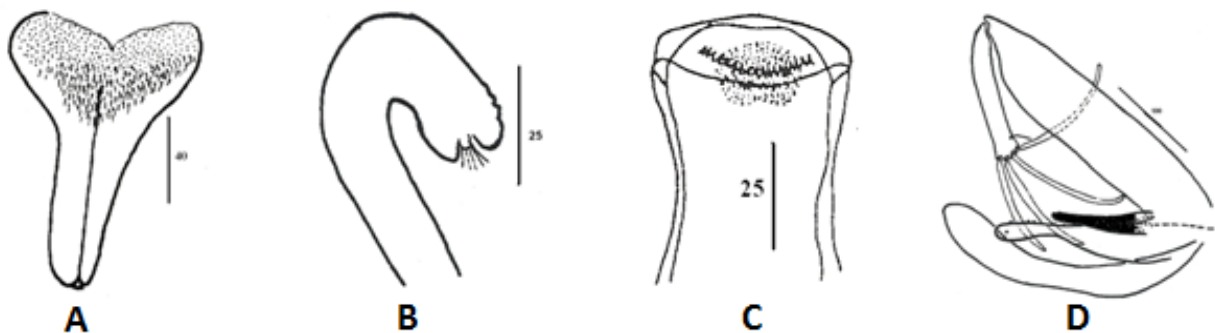


Figura 39. Características taxonómicas de *S. fallax*. (A) Faringe de hembra, (B) Espermateca de hembra, (C) Cibarium de macho, (D) Genitalia externa macho.

Género *Phlebotomus*; Subgénero *Larroussius* Nitzulescu, 1931

Las hembras tienen la cabeza de la espermateca pedunculada y con reservorios dilatados o divertículos en la base de los conductos espermáticos. Los machos tienen el estilo corto con 5 espinas, dos de ellas terminales. Presentan también un tufo de sedas en el coxito, pero no tienen lóbulo basal.

***P. perniciosus* Newstead, 1911.**

Hembra: Las espermatecas tienen 9-12 anillos de tamaño variable (más pequeños en los extremos), cuello bastante largo, cabeza bien definida y conductos



espermáticos estriados. Presentan un divertículo en la base del conducto espermático con paredes espesas y refringentes (Figura 40, C y D).

Macho: Tufo de sedas del coxito en número inferior a 15 (*P. longicuspis* > 15). Las valvas peneanas son generalmente bifurcadas de forma variable, terminando en dos puntas agudas, o unifurcadas (similar a *P. longicuspis*) (Figura 40, B; Figura 45, B).

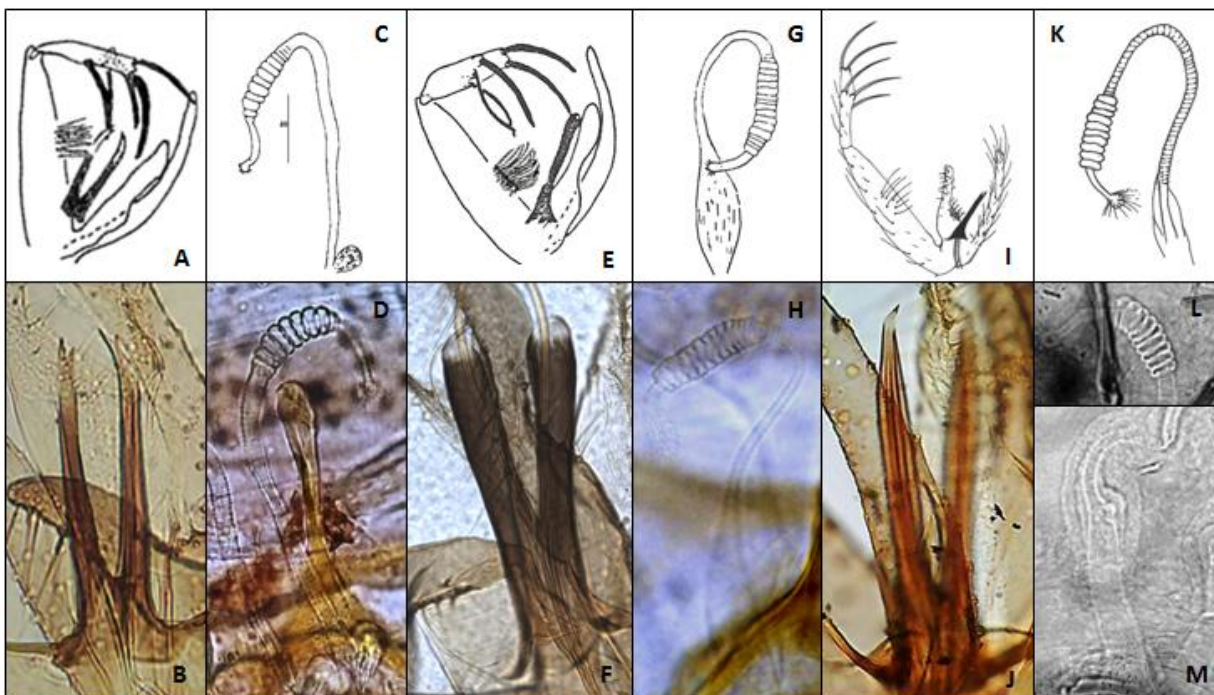
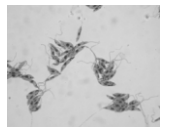


Figura 40. Características taxonómicas del subgénero *Larroussius*. Genitalia externa macho: (A) *P. perniciosus*, (E) *P. ariasi*, (I) *P. langeroni*; Valvas peneanas de macho: (B) *P. perniciosus*, (F) *P. ariasi*, (J) *P. langeroni*; Espermateca de hembra: (C y D) *P. perniciosus*, (G y H) *P. ariasi*, (K, L y M) *P. langeroni*.

***P. ariasi* Tonnoir, 1921.**

Hembra: La espermateca presenta 12-14 anillos uniformes y cuello espermático corto con un diámetro ligeramente inferior al de la cabeza. La base del conducto espermático está dilatada en forma de huso, pero sin divertículo (Figura 40, G y H). Faringe con pequeños pliegues irregulares.

Macho: El coxito tiene insertadas de 16 a 32 sedas fuertes (Figura 40, E). Valvas peneanas con forma de badajo de campana (Figura 40, F; Figura 45, B).



***P. langeroni* (Nitzulescu, 1930).**

Hembra: La espermateca presenta 9-10 anillos (Figura 40, K y L), y el conducto espermático termina en una dilatación fusiforme característica de esta especie (Figura 40, K y M).

Macho: Las valvas peneanas acaban en una única punta cortada en bisel y asimétrica (Figura 40, J; Figura 45, B).

Género *Phlebotomus*; Subgénero *Paraphlebotomus* Theodor, 1948

La hembra posee conductos espermáticos anillados y sin modificaciones en su base, con cabezas sésiles y armadura faríngea de aspecto reticulado. El macho tiene los estilos cortos y rechonchos, mostrando 4 espinas largas, 2 terminales y 2 subterminales, y un lóbulo basal en la base del coxito que está rodeado de sedas.

***P. sergenti* Parrot, 1917.**

Hembra: La espermateca tiene 4-6 anillos. El anillo distal es globuloso y sentado, con similar longitud que anchura (Figura 41, I y L). La armadura faríngea presenta terminaciones apicales largas y sinuosas (Figura 41, E y H).

Macho: El estilo es rechoncho y muy corto, con 4 espinas (2 terminales y 2 subterminales). Tufo de sedas cubriendo todo el lóbulo basal del coxito. Las valvas peneanas terminan en puntas incurvadas hacia dentro (Figura 41, A y D; Figura 45, D).

***P. alexandri* Sinton, 1928.**

Hembra: Anillo distal de la espermateca circundando a la cabeza y sensiblemente aplanado (es decir, netamente más ancho que largo) respecto al de *P. sergenti* (Figura 41, J). La armadura faríngea está dispuesta en el cuarto basal y de forma densa (Figura 41, F).



Macho: El estilo es más alargado que en *P. sergenti* con una espina terminal. El lóbulo basal del coxito más grueso y corto que el de *P. sergenti*, y rodeado por un tufo de abundantes sedas largas (Figura 41, B). Valvas peneanas con bordes casi paralelos y terminada en “proa de canoa” (Figura 45, D).

***P. chabaudi* Croset et al., 1970.**

Hembra: El anillo distal de la espermateca es acampanado y pedunculado (Figura 41, K). La armadura faríngea se prolonga por los bordes (Figura 41, G).

Macho: El estilo es corto, similar al de *P. alexandri*, con 2 espinas terminales. El lóbulo basal del coxito es más largo y estrecho que en *P. sergenti* y con 6-10 sedas (netamente más largas que las de *P. sergenti*) (Figura 41, C). Valvas del pene puntiagudas y transparentes en su extremo (Figura 45, D).

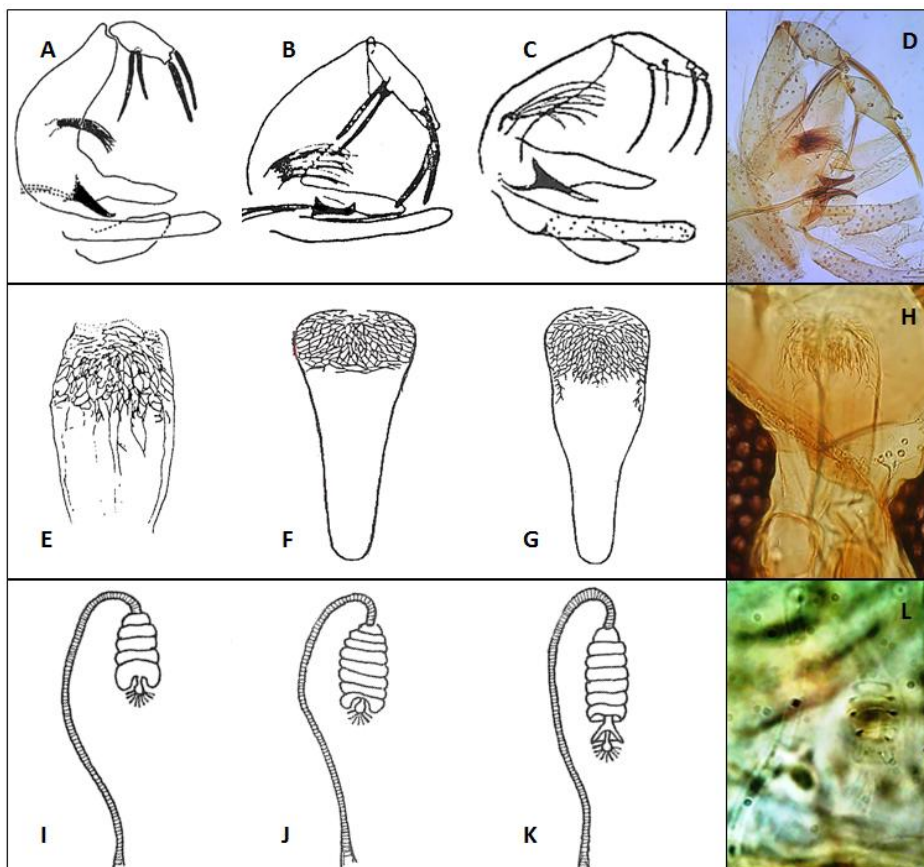
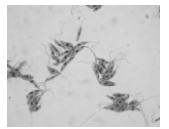


Figura 41. Características taxonómicas del subgénero *Paraphlebotomus*. Genitalia externa de macho: (A) *P. sergenti*, (B) *P. alexandri*, (C) *P. chabaudi*, (D) Imagen real de *P. sergenti*; Armadura faríngea: (E) *P. sergenti*, (F) *P. alexandri*, (G) *P. chabaudi*, (H) Imagen real de *P. sergenti*; Espermateca de hembra: (I) *P. sergenti*, (J) *P. alexandri*, (K) *P. chabaudi*, (L) Imagen real de *P. sergenti*.



Género *Phlebotomus*; Subgénero *Phlebotomus* Rondani, 1843

La hembra presenta una espermateca con una forma similar al subgénero *Paraphlebotomus*, pero con mayor número de anillos en el reservorio (o cuerpo) de la espermateca, y una armadura faríngea de aspecto escamoso en filas transversas que es sensiblemente distinta a la presente en *Paraphlebotomus*. Macho con estilo largo y delgado, con 5 espinas, 3 terminales y 2 subterminales.

***P. papatasi* Scopoli, 1786.**

Hembra: La espermateca tiene 9-10 anillos, con la cabeza directamente unida al reservorio y rodeada por el último anillo (Figura 42, A). La armadura faríngea es escamosa con denticulaciones en la región basal (Figura 42, B).

Macho: La genitalia externa está mucho más desarrollada que en el resto de especies españolas. Estilo largo y delgado con 5 espinas cortas (3 terminales), tufo de sedas en la parte apical del coxito, y lóbulo basal del coxito sentado con 10-12 sedas (Figura 42, C). Valvas peneanas de forma cónica y extremo romo (Figura 45, C).

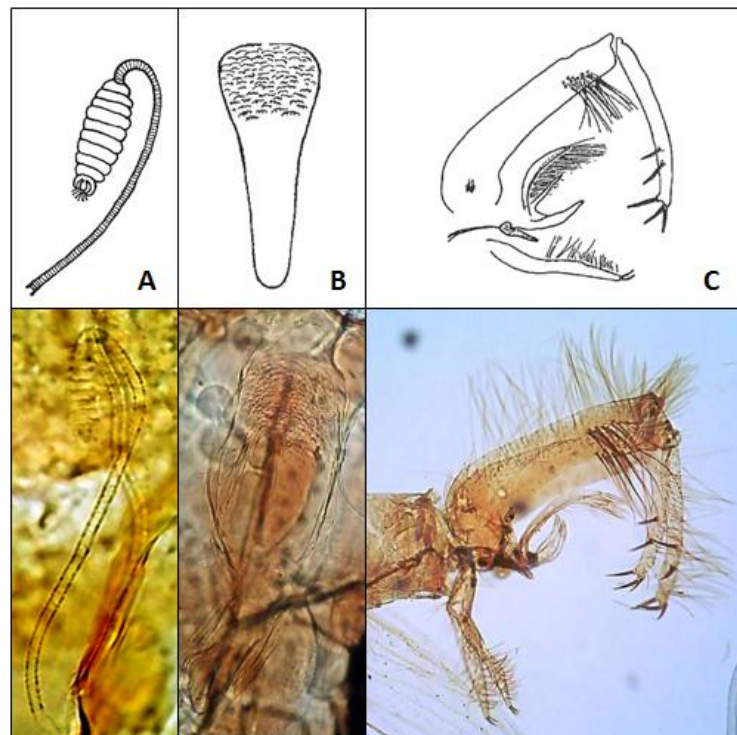


Figura 42. Características taxonómicas de *P. papatasi*. (A) Espermateca de hembra, (B) Faringe, (C) Genitalia externa de macho.

**Género *Phlebotomus*; Sub-género *Adlerius* Nitzulescu, 1931**

La hembra presenta conductos espermáticos dilatados en la región próxima al reservorio, el cual no muestra anillos pero sí estriaciones transversales. El macho presenta un estilo corto con 5 espinas, 2 de ellas terminales. El coxito no tiene lóbulo basal.

***P. mascittii* Grassi, 1908.**

Hembra: La espermateca presenta forma de saco con profundas estriaciones, pero sin anillos netamente diferenciados (Figura 43, A).

Macho: Genitalia externa similar a *Larroussius*, con valvas peneanas afiladas que se estrechan progresivamente y terminan en punta maciza y roma (Figura 43, B y C; Figura 45, E).

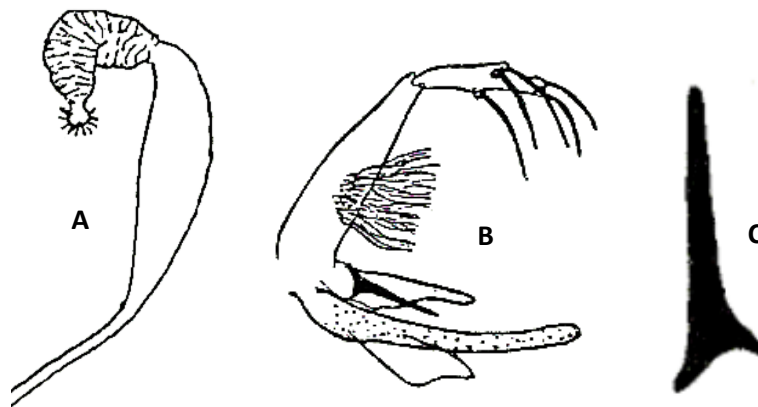
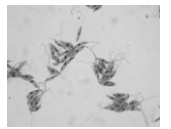


Figura 43. Características taxonómicas de *P. mascitti*. (A) Espermateca de hembra, (B) Genitalia externa de macho, (C) Valva peneana de macho.

Género *Phlebotomus*; Sub-género *Abonnencius* Morillas Márquez et al., 1984

Las hembras presentan faringes con bordes cuarteados y espermatecas con largos conductos espermáticos. Los machos se caracterizan por presentar las valvas del pene tronco-cónicas, unidas a una estructura aneja en forma de media luna, y largos filamentos genitales.



***P. fortunatarum* Úbeda-Ontiveros et al., 1982.**

Hembra: Las espermatecas tienen la cabeza pequeña, cuello poco definido, y conductos espermáticos extremadamente largos. Estas espermatecas tienen una forma tubular con paredes lisas y poco más anchas que los conductos espermáticos (Figura 44, A). La faringe presenta estrías oblicuas y bordes cuarteados (Figura 44, B).

Macho: Genitalia externa con valvas peneanas troncocónicas y con estructura aneja en forma de media luna y largos filamentos genitales (Figura 44, C y D).

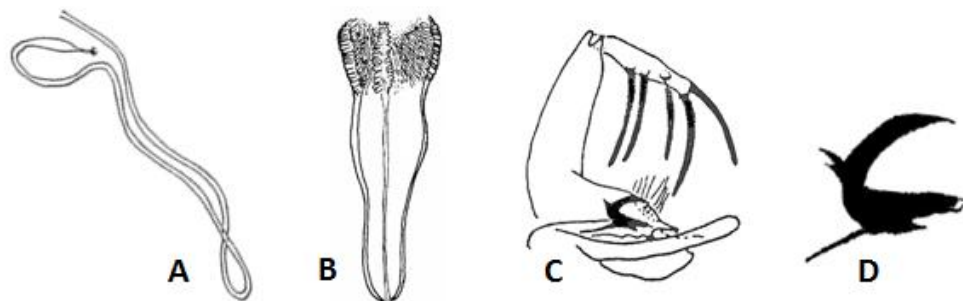


Figura 44. Estructuras taxonómicas de *P. fortunatarum*. (A) Espermateca de hembra, (B) Faringe, (C) Genitalia externa de macho, (D) Valva peneana de macho.

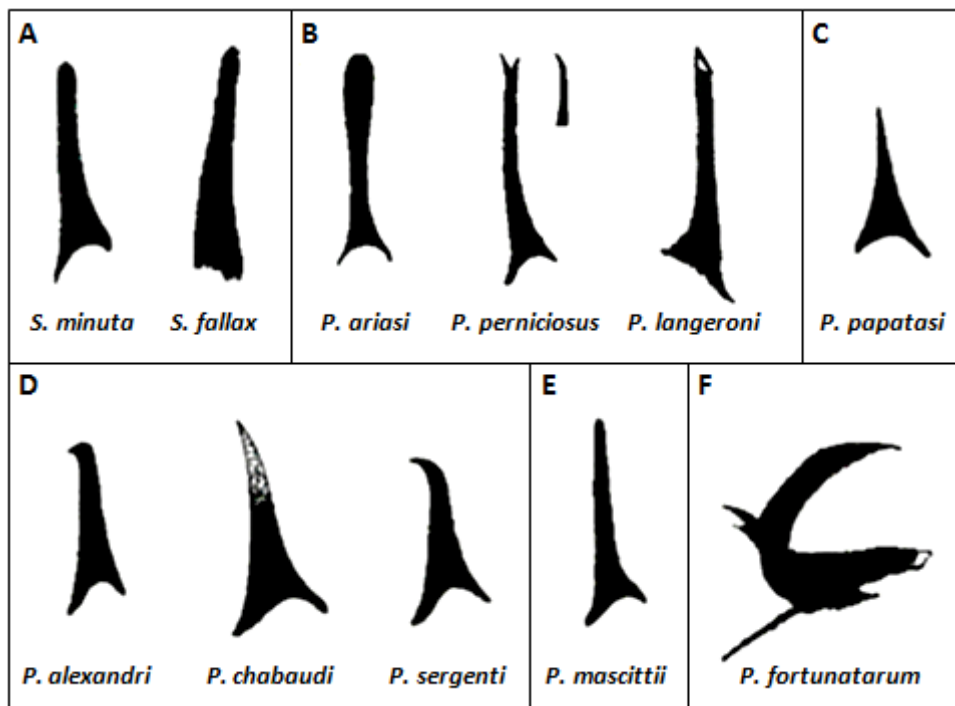


Figura 45. Aedeagus o valvas peneanas de las especies de flebotomos descritas en España. (A) Subgénero *Sergentomyia*, (B) Subgénero *Larrousius*, (C) Subgénero *Phlebotomus*, (D) Subgénero *Paraphlebotomus*, (E) Subgénero *Adlerius*, (F) Subgénero *Abonnencius*.



1.8. Leishmania infantum

La leishmaniosis producida por *Leishmania infantum* es una zoonosis, ya que en su ciclo biológico están implicados reservorios animales, y el hombre se infecta accidentalmente. Se considera una de las leishmaniosis zoonóticas más extendidas, causando patologías tanto cutáneas como viscerales en el hombre, perro y otros hospedadores vertebrados, aunque se considera al perro como su principal reservorio (Martin-Sánchez et al., 2004; Gramiccia y Gradoni, 2005). Sus principales vectores demostrados son varias especies de flebotomos pertenecientes al subgénero *Larroussius* y *Adlerius* del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y del subgénero *Lutzomyia* del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo.

1.8.1. Encuadre taxonómico de *L. infantum*

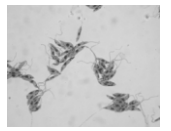
La especie *L. infantum* está englobada dentro del subgénero *Leishmania*, y a su vez dentro del complejo *L. donovani*, tal y como se puede observar en la Figura 1 que muestra la taxonomía general del género *Leishmania*. Dentro del complejo *L. donovani* se incluyen: *L. donovani*, *L. archibaldi* y *L. infantum*. Se considera que *L. chagasi* es una especie sinónima a *L. infantum*, y que se diferencian exclusivamente por presentar una localización geográfica distinta (*L. infantum* en el Viejo Mundo y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo).

1.8.2. Distribución de *L. infantum*

Se pueden encontrar zonas endémicas de *L. infantum* tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo, por lo que esta parasitosis presenta una amplia distribución.

1.8.2.1 Distribución Mundial

Según la WHO (2010), de los 98 países donde se han dado casos autóctonos de leishmaniosis, en 61 de éstos se han dado casos de *L. infantum*. Estos países se



localizan en 4 continentes distintos: Europa, Asia, África y América (América del Norte y Sudamérica).

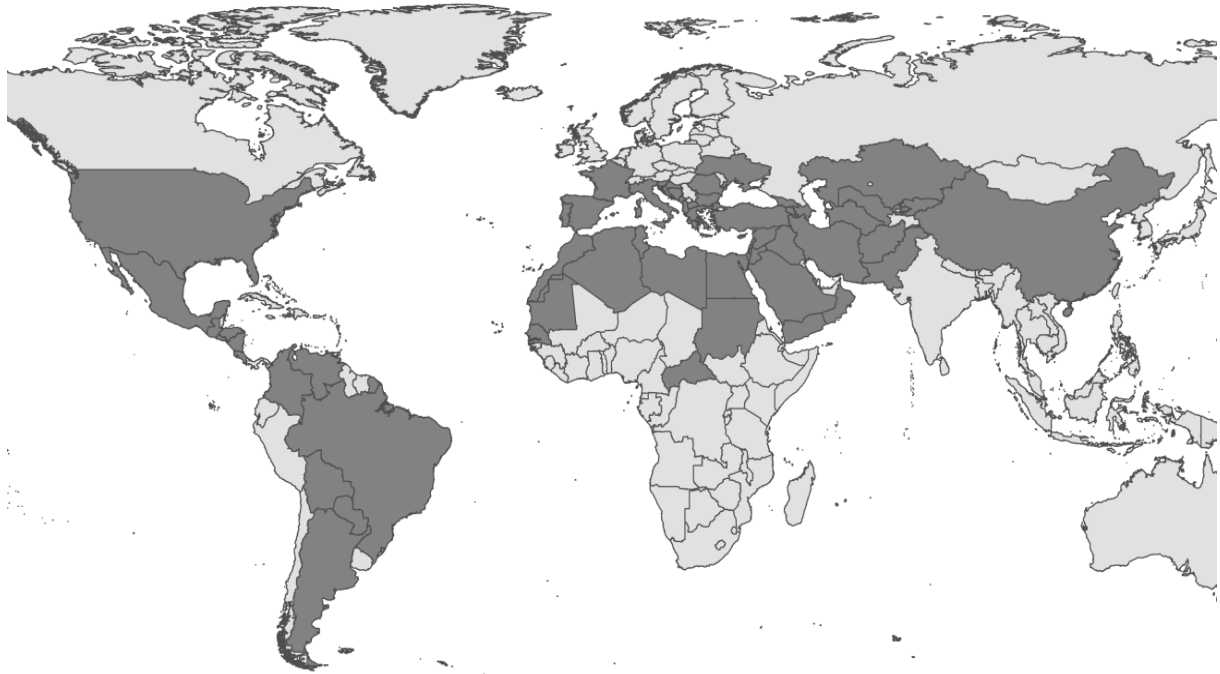


Figura 46. Distribución mundial de *L. infantum*. El gris oscuro indica los países en los que se han declarado casos autóctonos en humanos y/u otros hospedadores vertebrados según la WHO (WHO, 2010). Las localizaciones mostradas en el Nuevo Mundo han sido mencionadas como infección por *L. chagasi* (= *L. infantum*).

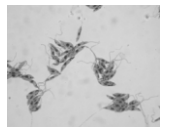
Cabe destacar que aunque el centro y norte de Europa se consideran zonas no endémicas de este parásito, en los últimos años se han publicado algunos casos de leishmaniosis canina, humana y de otros hospedadores en varias de estas zonas, como es el caso de Alemania y zonas no endémicas de Francia entre otros países (Bogdan et al., 2001; Koehler et al., 2002; Faber et al., 2012). Se considera que algunos de estos casos podrían ser autóctonos. Esto podría indicar que la actual distribución geográfica de la leishmaniosis puede estar sufriendo una expansión, desde las zonas endémicas del sur, hacia el norte de Europa por un posible efecto del calentamiento global, entre otros motivos (Aspöck et al., 2008; Faber et al., 2012; Miró et al., 2012). En EEUU se ha visto un elevado número de casos de leishmaniosis canina debida a *L. infantum* en perros de caza, aunque en este caso se puede deber a transfusiones sanguíneas y prácticas clínicas inadecuadas, como la reutilización del material de laboratorio (Enserink, 2000).



También se considera importante en este cambio de la distribución actual de la leishmaniosis, el transporte de animales infectados desde zonas endémicas a zonas no endémicas, que junto con la posible extensión de los vectores de *L. infantum* hacia zonas donde antes no estaban presentes, podría permitir la posible emergencia de casos autóctonos en latitudes donde tradicionalmente no se producirían.

1.8.2.2. Distribución en España

La leishmaniosis cutánea y visceral del hombre, perro y otros hospedadores vertebrados, en España se considera endémica, y es producida exclusivamente por *L. infantum* (Martín-Sánchez et al., 1996; Gállego et al., 2002; Martín-Sánchez et al., 2004; Galvez et al 2010b). Para poder establecer la distribución de este protozoo en nuestro país es necesario tener en cuenta principalmente a la leishmaniosis canina y a la humana. En España la leishmaniosis canina presenta una mayor prevalencia que la leishmaniosis humana, y se considera que es una de las principales causas de mortalidad en cánidos. En humanos se produce una incidencia media de 0'18-0'40 (casos/100.000 hab.), mientras que en perros la prevalencia media es del 8'5%, aunque no se distribuyen de manera uniforme (Portus et al., 2007; Dujardin et al., 2008; Valcarcel et al., 2008; Alvar et al., 2012). Por ejemplo en la leishmaniosis canina, la prevalencia varía entre el 3'7% de la provincia de Orense y el 34'6% de la provincia de Málaga (Morillas-Márquez et al., 1996; Amusategui et al., 2004; Miró et al 2012). Se considera que en el sur, en el centro y en el este de la Península Ibérica es donde se establece una mayor prevalencia canina. Por el contrario, el norte de la península tradicionalmente se ha considerado una zona no endémica, a pesar de los pocos datos existentes. Aunque generalmente las prevalencias halladas en esta zona son bajas, actualmente se han encontrado focos en los que esta prevalencia es mayor, lo que podría estar en relación con la mayor sensibilidad de las técnicas usadas (Amusategui et al., 2004; Miró et al., 2012). Por lo tanto se podría considerar que *L. infantum* no presenta una distribución homogénea, pero está presente en toda



las regiones de España con la posible excepción de las Islas Canarias. Aunque en estas últimas se han detectado casos de leishmaniosis, se considera que todos ellos son importados (Chicharro et al., 2003), excepto uno que parece ser autóctono (Lemes et al., 2005). De confirmarse esto último la distribución de *L. infantum* en España sería general.

1.8.3. Patología de *L. infantum*

La especie *L. infantum* es responsable de producir leishmaniosis visceral y/o cutánea en el hombre, perro y otros hospedadores vertebrados (Martín-Sánchez et al., 1996; Martín-Sánchez et al., 2004; Gramiccia y Gradoni, 2005). La importancia de tener un buen conocimiento de los síntomas clínicos que produce esta enfermedad radica en que, aunque no son síntomas patognomónicos y pueden ser confundidos con los de otras patologías, orientan sobre la posible existencia de la misma (Maia y Campino, 2008). Cabe destacar que en los casos de inmunosupresión, como puede ser por trasplante o infección por VIH, se pueden producir otras patologías menos frecuentes como son la leishmaniosis cutánea post kala-azar, leishmaniosis cutánea difusa, y afección de mucosas de las vías aéreas superiores y mucosas genitales (WHO, 2010). Las características de estas patologías menos frecuentes ya se han descrito en la patología general de la leishmaniosis por lo que en este apartado se van a detallar exclusivamente algunas de las características principales de la leishmaniosis cutánea y visceral típicas de *L. infantum*. Se considera que las características patológicas humanas y caninas que produce este parásito no presentan grandes diferencias (Alvar et al., 2004).

1.8.3.1. Leishmaniosis visceral producida por *L. infantum*

La leishmaniosis visceral es la forma más severa causada por *L. infantum* y se caracteriza por la presencia de episodios febriles intermitentes de intensidad variable, sudores nocturnos, hepato-esplenomegalia, delgadez progresiva que puede



terminar en caquexia y linfadenopatías (Ashford, 2000). Según la WHO también aparecen granulocitopenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia, y anemia (WHO, 2010). Inmunológicamente destaca la aparición de altos niveles de IgG (hipergammaglobulinemia), que se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad. En casos de inmunosupresión, se pueden producir una leishmaniosis cutánea post kala-azar (infecciones secundarias de la piel después de la supuesta cura de una leishmaniosis visceral, o durante la leishmaniosis visceral activa) (WHO, 2010).

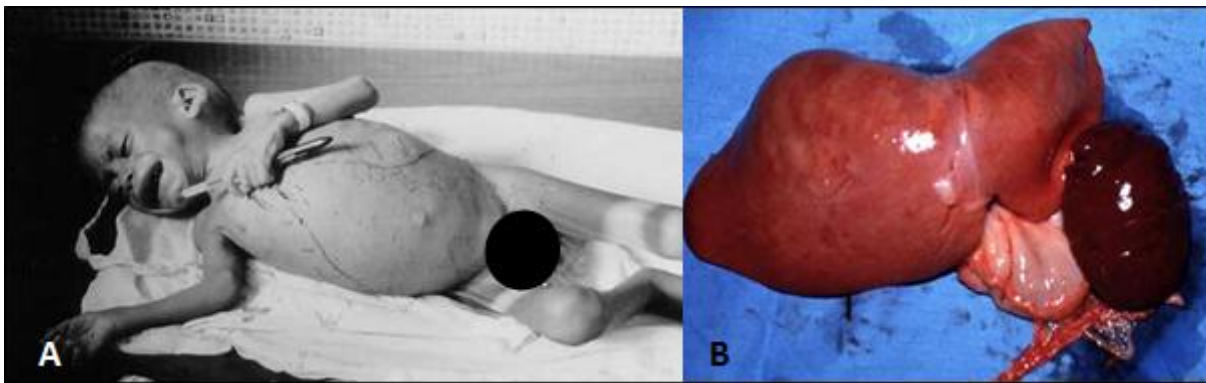
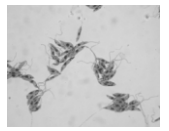


Figura 47. Leishmaniosis visceral producida por *L. infantum*. (A) Hepato-esplenomegalia en niño de Honduras, (B) Hepato-esplenomegalia en autopsia de niño fallecido por leishmaniosis visceral. Imágenes obtenidas de www.pathobio.sdu.edu.cn.

Una vez se ha superado la barrera cutánea, tanto en el hombre como en el perro los parásitos suelen localizarse en bazo, hígado, ganglios linfáticos, medula ósea y riñones. En el perro no se suelen producir lesiones primarias en el punto de inoculación, aunque a veces si aparecen, siendo habitual una rápida diseminación del parásito por todo el organismo. Además es frecuente que acompañando a esta enfermedad se presente: atrofia muscular, insuficiencia renal, lesiones en huesos y articulaciones, epistaxis o hemorragias nasales derivadas de la trombocitopenia, onicogriphosis, manifestaciones oculares, lesiones nodulares en la lengua, adenopatías, anemia, leucopenia, etc. (Solano Gállego et al., 2001; Alvar et al., 2004; Pinna-Parpaglia et al., 2007; Baneth et al., 2008; Maia y Campino, 2008).



1.8.3.2. Leishmaniosis cutánea producida por *L. infantum*

La leishmaniosis cutánea producida por *L. infantum* acostumbra a aparecer de forma localizada en el lugar de inoculación del parásito, debido a que se produce una rápida respuesta inmune celular mediada por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Este tipo de leishmaniosis en la mayoría de los casos es benigna y generalmente autocurativa. La presentación normal de la enfermedad suele ser una pápula eritematosa, que se transforma en un nódulo indoloro y a veces ligeramente pruriginoso, y que se ulcera precozmente en la mitad de los casos. Normalmente se presentan formas papulonodulares eritematosas con formación de costra (aprox. 60%), aunque también puede presentar formas papulosas sin formación de costra (aprox. 25%) (Urrutia et al., 2000). Estas lesiones cuando crecen pueden adoptar distintas formas, producen adenopatías hasta en un 25% de los pacientes, y al curar dejan cicatriz e inmunidad que suele ser permanente (Urrutia, 2001).



Figura 48. Leishmaniosis cutánea producida por *L. infantum*. (A) Nódulo eritematocostroso, (B) Placa eritemato- costrosa infiltrada, (C) Nódulo eritematoso. Imágenes tomadas de Urrutia et al. (2000).

También puede producir lesiones cutáneas crónicas que se caracterizan por presentar un nódulo crónico indoloro, que con frecuencia se ve acompañado por una placa eritematosa rodeada de pápulas coalescentes que responden pobremente al tratamiento (Urrutia, 2001). Las lesiones se suelen localizar en las zonas más expuestas a la picadura de los flebotomos, principalmente en cabeza y cuello, con porcentajes superiores al 70% (Alcalde-Alonso et al., 1989; Dauden et al., 1990;

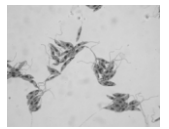


Urrutia et al., 2000). En los casos de inmunosupresión, la barrera creada por el sistema inmune celular se puede ver superada, y el parásito se puede extender por el organismo dando lugar a leishmaniosis cutánea difusa, y leishmaniosis cutáneo-mucosa (en los casos en los que se produce una infección secundaria en las mucosas de las vías aéreas superiores y en las mucosas genitales) (Gállego y Riera, 2000; WHO, 2010). También se han descrito lesiones mucosas estrictas (Aliaga et al., 2003).

En los perros las lesiones iniciales en el punto de inoculación del parásito suelen darse por norma general en el hocico y en las orejas (Vidor et al., 1991). Acompañando a estas lesiones cutáneas es frecuente la presencia de: descamación cutánea, alopecia, y dermatitis pustular, nodular, ulcerativa o exfoliativa, entre otros síntomas (Solano-Gallego et al., 2001; Alvar et al., 2004; Pinna-Parpaglia et al., 2007; Baneth et al., 2008; Maia y Campino, 2008). No obstante, en los perros no se produce una leishmaniosis cutánea estricta.



Figura 49. Lesiones comunes producidas por *L. infantum* en el perro. (A) Lesión cutánea con infiltración en oreja, (B) Lesión mucosa en nariz con pérdida de tejido, (C) Lesión cutánea en pata, (D) Lesiones nodulares en lengua, (E) Onicogriposis. Obtenidas de Morales-Yuste (2012).



1.8.4. Ciclo de Vida de *L. infantum*

El ciclo de vida de *L. infantum* sigue el ciclo general del género *Leishmania* explicado en el punto 1.3.3. Al pertenecer al subgénero *Leishmania* en el hospedador invertebrado presenta un ciclo suprapilórico. La particularidad que cabe destacar en esta especie es que, por su carácter zoonótico, en su ciclo de vida interviene un reservorio animal (principalmente el perro, u otros cánidos), mientras que el hombre se considera que es un hospedador accidental. El ciclo de *L. infantum* se puede dividir en ciclo selvático (sus reservorios serían cánidos salvajes como por ejemplo el zorro o el lobo), y ciclo doméstico (su reservorio sería el perro doméstico). Al igual que en el resto de especies de *Leishmania*, el hospedador invertebrado es el flebotomo, principalmente varias especies pertenecientes a los subgéneros *Larroussius*, *Adlerius* y *Lutzomyia*.

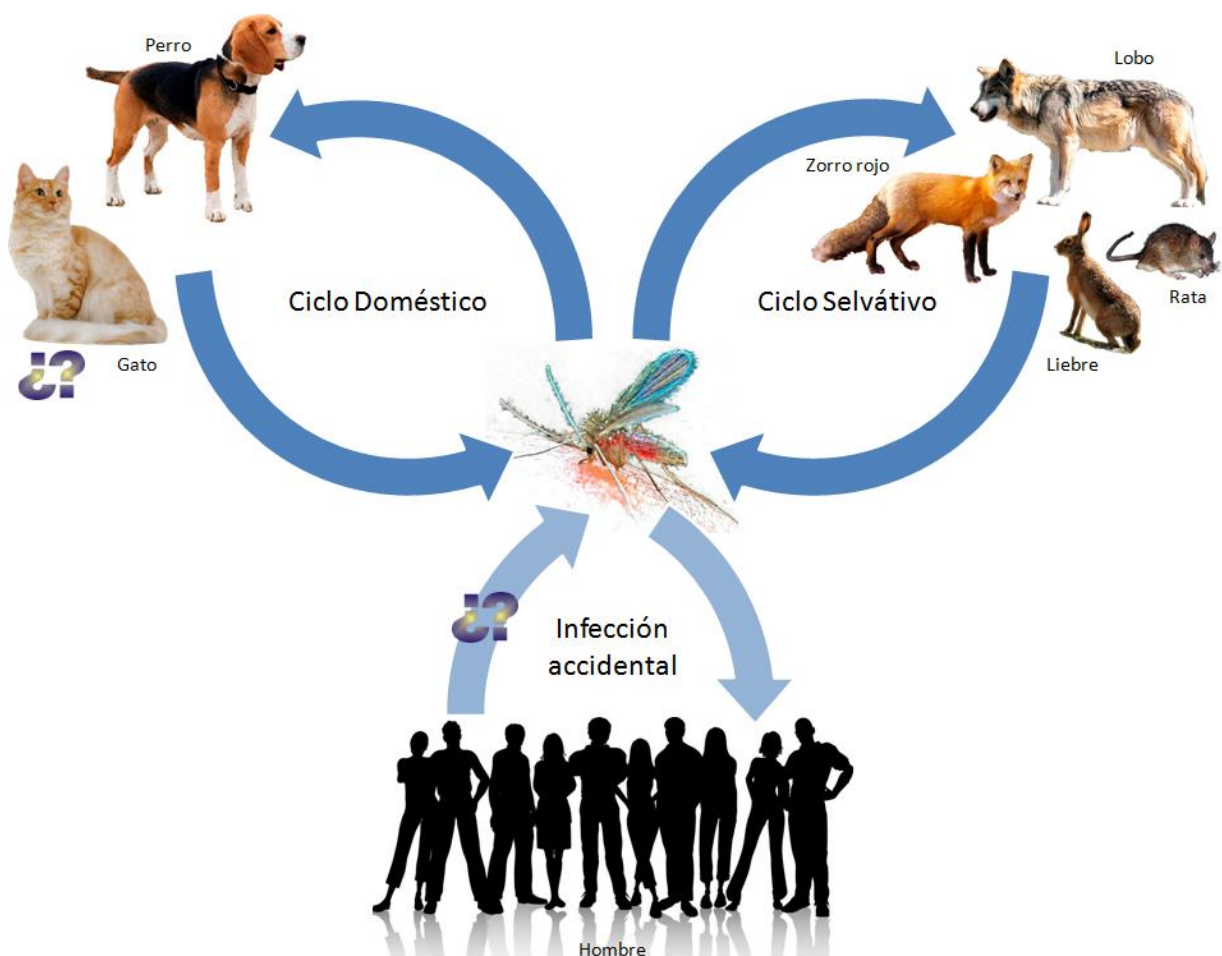


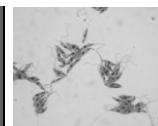
Figura 50: Esquema del ciclo biológico de *L. infantum*.



1.8.5. Reservorios de *L. infantum*

Se considera que el perro (*Canis familiaris*) es el principal reservorio animal de *L. infantum* (Acedo-Sanchez et al., 1996; Alvar et al., 2004), y por lo tanto el principal animal responsable del mantenimiento y distribución de este parásito (Alvar et al., 2004). Además del perro, son varias las especies de cánidos que se han encontrado infectados con *L. infantum* en varias partes del mundo, entre ellos el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), zorro hoary (*Lycalopex vetulus*), zorro grande (*Chrysocyon brachyurus*), perro venadero (*Spheotos venaticus*), chacal (*Canis aureus*), y lobo (*Canis lupus*) (Sastre et al., 2008; Luppi et al., 2008). A pesar de que la infección en estos cánidos es inferior a la hallada en perros, se considera que algunas de estas especies salvajes podrían actuar como hospedadores secundarios, e incluso ser capaces de mantener un ciclo selvático de la enfermedad. Este sería el caso del zorro rojo, el chacal y el lobo en el Viejo Mundo (Fisa et al., 1999; Mohebali et al., 2005; Sastre et al., 2008; Sobrino et al., 2008; Portús et al., 2002), y el zorro cangrejero en el Nuevo Mundo (Luppi et al., 2008).

También se han encontrado infectadas o con serología positiva frente a *L. infantum* otras especies animales, como son: la rata (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*) (Morillas-Márquez et al., 1985; Papadogiannakis et al., 2010); équidos (*Equus ferus caballus*) (Solano-Gallego et al., 2003); gatos (*Felis silvestris catus*) (Mancianti, 2004; Martín-Sánchez et al., 2007; Maia et al., 2010); ovejas (*Ovis orientalis aries*) y cabras (*Capra aegagrus hircus*) (Fisa et al., 1999); animales salvajes como la mangosta egipcia (*Herpestes ichneumon*), gineta (*Genetta genetta*) y lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Sobrino et al., 2008); liebres (Molina et al., 2012); conejo (Chitimia et al., 2011); canguro (Ramírez et al., 2013); e incluso primates en Brasil (Ej: *Callicebus nigrifrons*) (Malta et al., 2010). De entre estos hospedadores no cánidos, han despertado un interés especial los casos de leishmaniosis felina por su posible implicación en el ciclo doméstico de la enfermedad (Maroli et al., 2007; Martin-



Sanchez et al., 2007; Maia et al., 2010), y recientemente la liebre como un potencial reservorio selvático (Molina et al., 2012).

1.8.6. Vectores de *L. infantum*

Son varias las especies de flebotomo que se han encontrado infectadas con *L. infantum* en el medio natural, o que se sospechan que podrían actuar como vectores de este protozoo. Estas especies pertenecen tanto al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo como al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Se considera que casi la totalidad de estas especies estarían englobadas en los subgéneros *Larrousius* y *Adlerius* (Género *Phlebotomus*), y a los subgéneros *Lutzomyia* y *Pifanomyia* (Género *Lutzomyia*).

	Especie de <i>Leishmania</i>	Género	Subgénero	Especie	
Viejo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Larrousius</i>	<i>P. perniciosus</i>	
				<i>P. ariasi</i>	
				<i>P. perfiliewi</i>	
				<i>P. langeroni</i>	
				<i>P. neglectus</i>	
				<i>P. longicuspis</i>	
				<i>P. tobbi</i>	
				<i>P. kandelakii</i>	
				<i>P. smirnovi</i>	
				<i>P. transcaucasicus</i>	
				<i>P. syriacus</i>	
				<i>P. galilaeus</i>	
				<i>P. wui</i>	
				<i>Adlerius</i>	<i>P. chinensis</i>
					<i>P. balcanicus</i>
<i>P. longiductus</i>					
<i>Phlebotomus</i>	<i>P. halepensis</i>				
	<i>P. duboscqi</i> ¿?				
	<i>P. alexandri</i> ¿?				
Nuevo mundo	<i>L. infantum</i> (= <i>L. chagasi</i>)	<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i>	<i>Lu. longipalpis</i>	
				<i>Lu. cruci</i>	
				<i>Lu. almerioi</i>	
				<i>Lu. pseudolongipalpis</i>	
				<i>Lu. antunesi</i>	
				<i>Lu. evansi</i>	
				<i>Nyssomyia</i>	
				<i>Pifanomyia</i> (Grupo Verrucarum)	



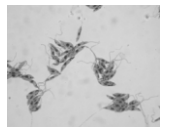
al., 2012). Estas dos especies se encuentran en mayor o menor medida distribuidas por casi todo el suroeste europeo, y su importancia como vectores depende de su abundancia y densidad relativas (Guevara-Benítez et al., 1978; Morillas-Márquez et al., 1983; Gil Collado et al., 1989). En la Tabla 2 se enumeran todas las especies que se han relacionado con *L. infantum* (Killick-Kendrick, 1990; WHO, 2010; Ready, 2010).

1.9. *Leishmania tropica*

La leishmaniosis producida por *Leishmania tropica* tradicionalmente se ha considerado una parasitosis antroponótica debido a que la principal fuente de infección de una persona es a través de la picadura del flebotomo después de alimentarse de otra persona con este protozoo. Este parásito causa casi exclusivamente patologías cutáneas, aunque también se han detectado algunos casos de leishmaniosis visceral (WHO, 2010). Aparte del hombre, se han encontrado varias especies animales infectadas con *L. tropica* (Pratlong et al., 2009) entre ellos el perro (Dereure et al., 1991), e incluso se ha demostrado la existencia de un reservorio animal de este parásito, el damán (Talmi-Frank et al., 2010a). Aún así, el hombre sigue siendo su principal reservorio (WHO, 2010; Pratlong et al., 2009). De esta manera actualmente se podría considerar que la leishmaniosis producida por *L. tropica* es una zoo/antroponosis (Talmi-Frank et al., 2010a). A pesar de que se acepta que hay varias especies de flebotomos capaces de transmitir a esta especie de *Leishmania*, se considera que su principal vector es *Phlebotomus sergenti*.

1.9.1. Encuadre taxonómico de *L. tropica*

La especie *L. tropica* está englobada dentro del subgénero *Leishmania*, y a su vez dentro del complejo *L. tropica*, tal y como se puede observar en la Figura 1 que muestra la taxonomía general del género *Leishmania*. El complejo *L. tropica* anteriormente estaba formado por *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*. Posteriormente se describió la especie *L. killicki* (Rioux et al., 1986c) que se incluyó en el complejo *L.*



tropica, hasta que Pratlong et al. (2009), consideró que este complejo estaba formado exclusivamente por *L. tropica* y por *L. killicki*, mientras que *L. major* y *L. aethiopica* formaban sus propios complejos. Esta última separación es la aceptada actualmente por la OMS (WHO, 2010).

1.9.2. Distribución de *L. tropica*

Al contrario de lo que pasa con *L. infantum*, no se tienen datos de leishmaniosis producida por *L. tropica* en el Nuevo Mundo, por lo que esta enfermedad se encuentra exclusivamente en el Viejo Mundo. Anteriormente sólo se tenían en cuenta los casos humanos de esta enfermedad para determinar su distribución, ya que se consideraba una parasitosis típicamente humana (leishmaniosis antroponótica). El hecho de haber encontrado infectados a otros hospedadores vertebrados distintos del hombre, ha puesto de manifiesto la necesidad de tener un mejor conocimiento de la infección en estos animales para completar la distribución de este parásito.

1.9.2.1 Distribución Mundial

Según la OMS (WHO, 2010), de los 98 países donde se han dado casos autóctonos de leishmaniosis, en 21 de éstos se han descrito casos de *L. tropica*. A parte de estos países podemos sumar otros 4 en los que también se ha citado la presencia de este parásito: Argelia (Mihoubi et al., 2008), Líbano (Pratlong et al., 2009), Túnez (Bousslimi et al., 2010) y Libia (Amro et al., 2012). Estos países se localizan en 3 continentes distintos: Europa, Asia y África. Gramiccia y Gradoni (2005) indican que el hallazgo de perros infectados por diversos zymodemos de *L. tropica* en el norte de África, constituye un riesgo de introducción de este flagelado en el sur de Italia por la importación de perros provenientes de estas zonas, o por el número creciente de casos humanos importados por inmigrantes y/o turistas provenientes de zonas endémicas de este parásito. Si a este hecho sumamos la presencia de *P.*



sergenti en el sur de Italia (D'urso et al., 2004), el establecimiento de un foco autóctono de *L. tropica* sería posible. De igual manera esto podría suceder en España, con el añadido de que en nuestro país *P. sergenti* está ampliamente extendido. En Grecia ocurren casos esporádicos de leishmaniosis cutánea debida a *L. tropica* (Ready et al, 2010b), siendo considerada zona endémica de esta parasitosis (WHO, 2010). A continuación se muestra como quedaría la distribución de esta especie.

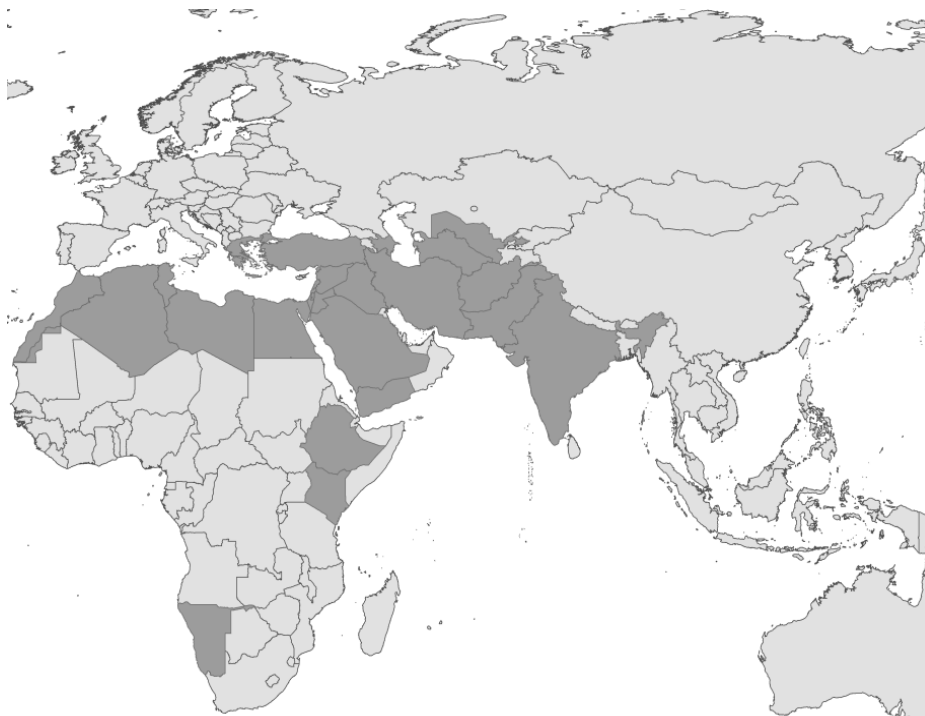
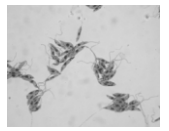


Figura 51. Distribución mundial de *L. tropica*. El gris oscuro indica los países en los que se han declarado casos autóctonos de *L. tropica* (Mihoubi et al., 2008; Pratlong et al., 2009; Bousslimi et al., 2010; WHO, 2010; Amro et al., 2012).

1.9.3. Patología de *L. tropica*

La leishmaniosis producida por *L. tropica* por norma general se trata de una enfermedad cutánea, aunque en algunos estudios se ha mencionado una patología visceral (Magill et al., 1993; Lemrani et al., 2002; Alborzi et al., 2008; Weiss et al., 2009). El hecho de que se produzca esta patología visceral podría estar relacionado con la cepas de *L. tropica* implicadas o con la respuesta inmune específica del hospedador (Weiss et al., 2009). Esta leishmaniosis con afección visceral se ha



denominado leishmaniosis viscerotrópica para diferenciarla de la leishmaniosis visceral originada por el complejo *L. donovani* (Magill et al., 1993). A pesar de la presencia de casos de leishmaniosis visceral por *L. tropica*, éstos no dejan de ser escasos y ocasionales. Los síntomas clínicos de esta patología visceral son comunes a los causados por otras especies de *Leishmania*: anorexia, pérdida de peso, esplenomegalia, anemia y transaminitis leve (Weiss et al., 2009). La patología causada por este protozoo también se ha comunicado en hospedadores animales, principalmente en el perro (Dereure et al., 1991; Lemrani et al., 2002; Mohebbi et al., 2005). Aún así su principal hospedador vertebrado sigue siendo el hombre, hecho apoyado por la obtención de hasta un 72% de cepas de origen humano respecto al total de cepas aisladas de *L. tropica* (Pratlong et al., 2009).

1.9.3.1. Leishmaniosis cutánea producida por *L. tropica*

La leishmaniosis cutánea causada por *L. tropica* acostumbra a ser indolora, produce úlceras secas, y normalmente presenta más de una lesión a la vez (WHO, 2010). Su periodo de incubación suele ser de semanas a 8 meses aunque se han producido casos años después de la infección (Weiss et al., 2009). Estas lesiones cutáneas por lo general sanan espontáneamente en torno a un año, o en algunos casos algo más, y a menudo quedan cicatrices deformantes.



Figura 52. Lesiones producidas por *L. tropica*. (A) Lesiones en la pre-tibia (Weiss et al., 2009), (B) Lesiones en la cara (Pratlong et al., 2009).



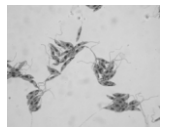
Esta patología también puede presentar una forma crónica recidivante (o leishmaniosis lupoide) que puede durar varios años. Uno o dos años después de que la lesión aguda se cure, en el margen de la cicatriz generada tras esta curación, aparecen nuevos nódulos y pápulas que presentan un aspecto granulomatoso y a menudo escamoso. Las lesiones producidas por esta forma crónica suelen progresar lentamente y si no se trata es destructiva y desfigurante. Debido a que este tipo de leishmaniosis cutánea crónica presenta un gran parecido clínico e histológico con el 'lupus vulgaris', su correcto diagnóstico depende de la detección de amastigotes de *Leishmania*, principalmente en los cortes histológicos obtenidos de la lesión. La dificultad de este diagnóstico radica en la escasez de amastigotes en las lesiones de este tipo de leishmaniosis. Aunque esta forma cutánea recidivante puede ser causada por más de una especie de *Leishmania*, *L. tropica* es el agente causante más frecuente (Gangneux et al., 2007; Nilforoushzadeh et al., 2008; WHO, 2010; Khaled et al., 2011).



Figura 53. Lesiones cutáneas nodulares hiperqueratósicas y leishmaniosis recidivante producidas por *L. tropica*. Imagen obtenida de Bailey y Lockwood (2007).

1.9.4. Ciclo de vida de *L. tropica*

El ciclo de vida de *L. tropica* sigue el ciclo general del género *Leishmania* explicado en el punto 1.3.3. Al pertenecer al subgénero *Leishmania* en el hospedador invertebrado presenta un ciclo suprapilórico. La particularidad que cabe destacar en



esta especie es que presenta dos ciclos epidemiológicos distintos: un ciclo antroponótico (frecuentemente denominado antroponótico urbano), y un ciclo zoonótico (o ciclo rural) (Svobodová et al., 2006). En el ciclo antroponótico, tal y como su nombre indica, como hospedador vertebrado sólo está implicado el hombre, por lo que la transmisión sería persona-persona a través de la picadura de un flebotomo. En el ciclo de vida zoonótico están implicados reservorios animales distintos al hombre. Actualmente el único animal que se ha establecido como reservorio demostrado de este ciclo zoonótico es el damán (Talmi-Frank et al., 2010a; Svobodova et al., 2006) y se sospecha del perro doméstico (Dereure et al., 1991). También se tiene conocimiento de infección en rata, chacal y zorro rojo, que aunque se consideran infecciones accidentales, es posible que mantengan un ciclo silvestre. Al igual que en el resto de especies de *Leishmania*, el hospedador invertebrado son varias especies de flebotomo, principalmente las pertenecientes al subgénero *Paraphlebotomus*, aunque especies de los subgéneros *Larroussius*, *Adlerius* y *Phlebotomus* también han sido implicadas.

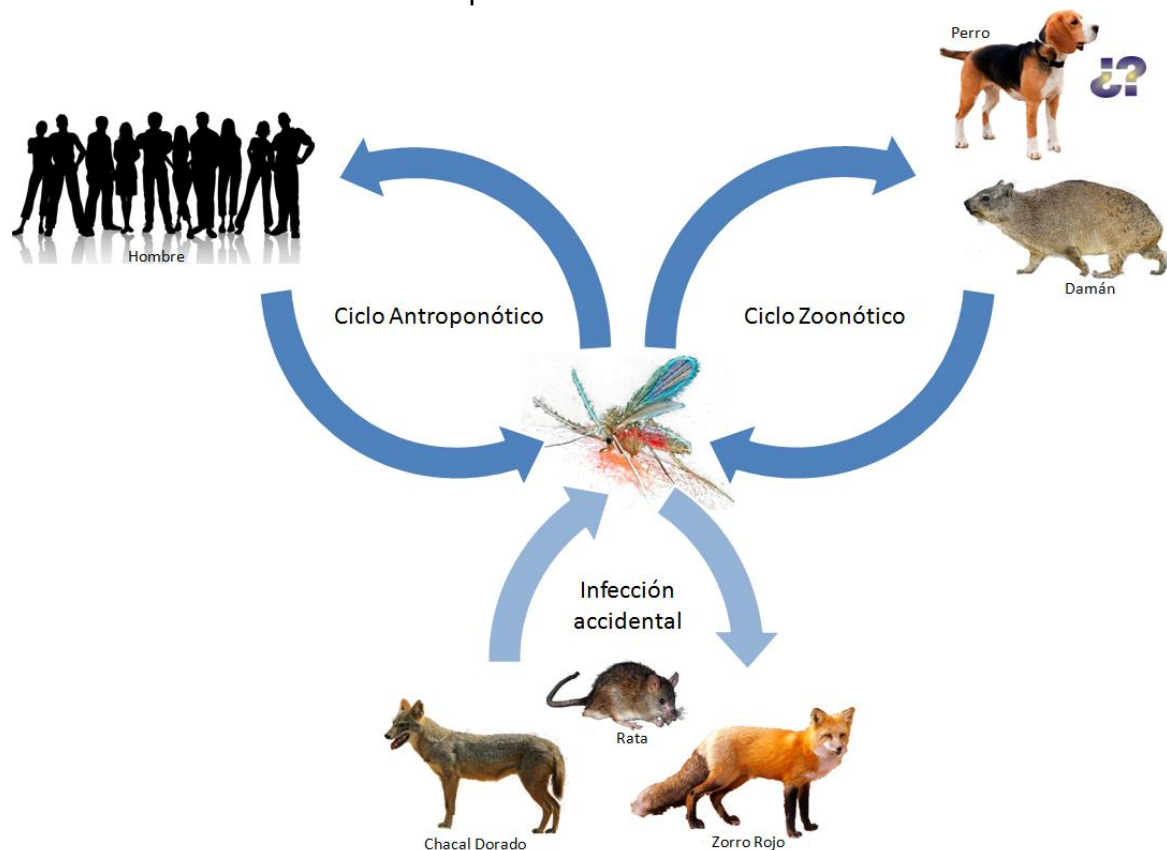


Figura 54: Esquema del ciclo biológico de *L. tropica*.

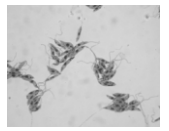


1.9.5. Reservorios de *L. tropica*

Como ya se ha mencionado anteriormente, la leishmaniosis producida por *L. tropica* se ha considerado tradicionalmente como una parasitosis antroponótica, por lo que se consideraba que el único reservorio era el hombre y la transmisión se producía persona-persona por intermediación del flebotomo. Posteriormente se han ido encontrando otros hospedadores vertebrados que se han hallado infectados por *L. tropica*. Este es el caso del perro doméstico (*Canis familiaris*), la rata (*Rattus rattus*), el chacal (*Canis aureus*), el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), y el damán (*Proavia capensis*) (Dereure et al., 1991; Lemrani et al., 2002; Svobodová et al., 2003; Svobodová et al 2006; Pratlong et al., 2009; Talmi-Frank et al., 2010a; Talmi-Frank et al., 2010b). Aunque estos animales se suelen catalogar como hospedadores minoritarios y/o accidentales, pueden contribuir en parte al mantenimiento de la enfermedad y volver a introducir al parásito desde un ámbito zoonótico al humano (WHO, 2010), por lo que en cierta manera podrían ejercer una función secundaria de reservorio.

El damán es el único animal en el que se ha confirmado el estatus de reservorio de la enfermedad. Esta función de reservorio tiene una gran importancia en la epidemiología de este protozoo, ya que se trata de un animal que permanece vivo en estado salvaje alrededor de 8-9 años, se pueden expandir rápidamente, y suelen vivir cerca de los asentamientos humanos e incluso entrar en las viviendas. Además, las madrigueras en las que habitan suelen ser un buen lugar de cría para los flebotomos, y al tener el damán hábitos diurnos, estos dípteros tienen facilidad para alimentarse de estos animales (Svobodová et al., 2006; Talmi-Frank et al., 2010a).

En el caso del perro, no se ha demostrado su función como reservorio, aunque al haberse encontrado afectado de leishmaniosis producida por *L. tropica*, se le ha mencionado como posible fuente de expansión a otras zonas no endémicas (Gramiccia y Gradoni, 2005). Éste es también el caso de los chacales y los zorros, en



los que se ha visto que también puede visceralizarse el parásito. Al contrario de lo que pasa con el damán, estos cánidos salvajes se desplazan grandes distancias, por lo que podrían distribuir a *L. tropica* desde zonas endémicas a zonas no endémicas en las que esté presente uno de sus vectores competentes. De esta manera, estos cánidos podrían estar implicados en el mantenimiento de un ciclo selvático transportando al parásito desde poblaciones de damanes infectados a otras poblaciones de damanes sanos alejadas entre sí, o posiblemente ser capaces de infectar a personas, ya que suelen vivir cerca de los asentamientos humanos y alimentarse de sus basuras (Talmi-Frank et al., 2010b).

1.9.6. Vectores de *L. tropica*

En la naturaleza se han encontrado varias especies de flebotomo infectadas con *L. tropica*, habiendo evidencias de que pueden estar implicadas en su transmisión. Estas especies se pueden agrupar en 5 subgéneros distintos: *Paraphlebotomus*, *Adlerius*, *Larroussius*, *Synphlebotomus* y *Phlebotomus*. A pesar de que son varias las especies implicadas, la mayoría de ellas suelen estar restringidas a zonas concretas. No ocurre lo mismo con la especie que constituye su principal vector, *P. sergenti* (*Paraphlebotomus*), ya que presenta una amplia distribución geográfica, ocupando gran parte de la cuenca mediterránea y ciertas zonas de África, Oriente Medio y Asia. Se considera que esta especie presenta una distribución mayor que la del parásito que transmite, y se ha observado que está presente en casi todos los países en los que se ha encontrado *L. tropica* (Depaquit et al., 2002; WHO, 2010).

El resto de especies serían *P. saevus* (*Paraphlebotomus*) en Etiopía, *P. arabicus* (*Adlerius*) en Israel, *P. guggisbergi* (*Larroussius*) en Kenia, *P. rossi* y *P. grovei* (*Synphlebotomus*) en Namibia, y *P. chabaudi* (*Paraphlebotomus*) en Marruecos (Grové, 1989; Gebre-Michael et al., 2004; Svobodová et al 2006; Pratlong et al., 2009; WHO, 2010). En el estudio de revisión de Killick-Kendrick (1990) sobre los flebotomos vectores de la leishmaniosis, también se recoge la especie *P. papatasi* (subgénero



Phlebotomus) como vector dudoso de *L. tropica*, aunque hasta el momento no se ha demostrado esta condición. Sin embargo, recientemente sí se ha demostrado de forma experimental que *P. duboscqi* (subgénero *Phlebotomus*) es capaz de adquirir naturalmente *L. tropica*, completar el ciclo en su interior, y transmitir este protozoo durante la toma de sangre en un nuevo hospedador vertebrado (Hanafi et al., 2013).

A continuación se enumeran todas las especies que se han relacionado con *L. tropica* (Killick-Kendrick, 1990; WHO, 2010; Ready, 2010).

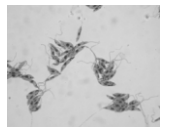
Especie de <i>Leishmania</i>		Género	Subgénero	Especie
Viejo Mundo	<i>L. tropica</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>Paraphlebotomus</i>	<i>P. sergenti</i>
				<i>P. saevus</i>
				<i>P. chabaudi</i>
				<i>P. arabicus</i>
			<i>Adlerius</i>	<i>P. guggisbergi</i>
				<i>P. rossi</i>
				<i>P. grovei</i>
			<i>Synphlebotomus</i>	<i>P. papatasi</i> (¿?)
				<i>P. duboscqi</i>

Tabla 3. Especies que se han relacionado con *L. tropica*. (¿?) Especie dudosa de actuar como vector de *L. tropica*.

1.10. Aplicación de los Sistemas de Información Geográfica en Epidemiología

La utilización de los Sistemas de Información Geográfica (SIG) nos permiten capturar, almacenar, manejar, visualizar y analizar datos geográficamente referenciados con el propósito de apoyar la toma de decisiones en la solución de problemas que ocurren en un espacio geográfico dado (Castillo-Salgado et al. 2003). Los estudios epidemiológicos se centran principalmente en la recogida de datos de la situación sanitaria de zonas concretas. Si junto con estos datos también se recogen localizaciones geográficas, se pueden investigar los factores clásicos de riesgo unidos a un patrón espacial.

Los SIG se han convertido en la actualidad en una excelente herramienta para el desarrollo de estudios epidemiológicos de enfermedades transmitidas por vectores (Eisen and Lozano-Fuentes, 2009; Srivastava et al., 2009; Chamaillé et al., 2010). En estos estudios se pone de manifiesto la importancia que tienen los factores climáticos



y medioambientales en la distribución de los distintos vectores, y de las enfermedades que éstos transmiten (Semenza y Menne 2009). En definitiva, la utilización de los SIG nos permite la integración de datos epidemiológicos y medioambientales dentro de un ámbito geográfico, y generar mapas predictivos de amplias zonas, que son un medio más expresivo y visual de analizar los resultados (King et al. 2004).

1.10.1. Aspectos generales de los Sistemas de Información Geográfica (SIG)

Los SIG tienen amplias aplicaciones en diferentes áreas como son urbanismo, ecología y gestión de utilidades, mostrando la importancia que tiene un punto de vista espacial en muchos de los procesos que nos rodean. En la actualidad, los SIG se han convertido en una plataforma universalmente aplicada para visualización y análisis de datos espaciales, mientras que el GPS (Global Positioning System) y la teledetección (RS, Remote Sensing) son importantes herramientas para obtener información geográfica en epidemiología (Zhou et al., 2009). Así, Los datos obtenidos mediante RS se están utilizando cada vez más para medir las variables ambientales y topográficas sobre el terreno (ej: vegetación, uso del terreno, cobertura del terreno, etc...), y los SIG se están usando para modelar estos datos tanto espacial como temporalmente. Estas propiedades permiten que las funciones SIG se utilicen para investigar relaciones medioambientales y generar mapas predictivos en amplias zonas y así poder centrar las medidas de control de enfermedades (King et al., 2004).

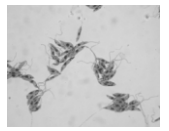
La recolección de datos espaciales implica una serie de procesos como son la captura, verificación y estructuración de los datos recogidos. Los datos digitales pueden obtenerse de un proveedor, de la digitalización de mapas de papel o el escaneado de imágenes, de datos recogidos en el campo manualmente, o mediante interpolado de valores digitales de puntos concretos. Durante los trabajos de campo, el uso de medios electrónicos para la recogida de datos (como por ejemplo el GPS) permite obtener información con una localización muy precisa, mientras que la



teledetección desde satélites y aviones permite la recolección de datos a partir de representaciones geográficas, reflejos de la tierra o emisividad para rangos definidos. La estructuración de los datos se refiere a los procesos involucrados en dar un formato adecuado a estos datos. Las proyecciones en las que se suelen representar los datos pueden darse en distintos formatos, aunque los más frecuentes son UTM (sistema militar americano) y coordenadas geográficas. Los datos obtenidos suelen llevar asociados metadatos descriptivos, que incluyen información de la fuente de datos, datos recogidos, cualquier manipulación de datos realizada, sistema de coordenadas, y resolución de los datos. La creación de estos metadatos es un proceso laborioso que normalmente no se tiene en cuenta, aunque es muy importante (Pfeiffer et al., 2008). La manera habitual de organizar y representar los conjuntos de datos es mediante la disposición en “capas” (serie de mapas de la misma porción del territorio, donde la localización de un punto tiene las mismas coordenadas en todos los mapas incluidos en el sistema).

En los estudios epidemiológicos, normalmente se obtienen datos de muestras recogidas en localizaciones puntuales o áreas concretas, con la finalidad de poder interpolar/extrapolar estos datos y de poder representarlos en superficies continuas de valores, tales como el riesgo de presencia de vectores de enfermedades o variables de exposición ambiental. Esta producción de superficies continuas permite una visualización mejorada de los datos, y normalmente se suele crear mediante ‘interpolación por Krigeado’ o mediante ‘núcleos suavizados’ (métodos geoestadísticos de estimación de puntos). Ambas técnicas de interpolación están incluidas en la mayoría de paquetes informáticos SIG (Pfeiffer et al., 2008).

La principal funcionalidad analítica de los SIG, y de la interpolación/extrapolación de datos a superficies continuas, es la producción de modelos y mapas descriptivos, ya que en la detección efectiva y el control de enfermedades en humanos y animales, es necesario tener en cuenta los patrones espaciales de la aparición de la enfermedad y cualquier factor de riesgo asociado a estos patrones.



Por lo tanto, los modelos generados no solo aportan información sobre los niveles de riesgo, sino que también aportan información sobre los factores que presentan una mayor influencia en este riesgo, y sobre cuáles de ellos se puede ejercer un control para la mitigación de este riesgo (Pfeiffer et al., 2008). El reconocimiento de la importancia del punto de vista espacial en el control de las enfermedades queda de manifiesto por el creciente uso de los SIG en los estudios epidemiológicos actuales.

Los primeros estudios sobre la leishmaniosis que usaron la tecnología SIG, como nuevo medio para intentar entender la biología de los flebotomos vectores, surgieron en la década de los 90 del siglo pasado (Peterson y Shaw, 2003). A partir de estos primeros trabajos son varios los estudios que se han realizado siguiendo esta metodología (Rispaill et al., 2002; Peterson y Shaw, 2003; King et al., 2004; Sudhakar et al., 2006; Claborn et al., 2008; Bhunia et al., 2009; Chamaillé et al., 2010; González et al., 2010; Franco et al., 2011; Gálvez et al., 2011; etc...).

1.10.2. Beneficios de la aplicación de los SIG

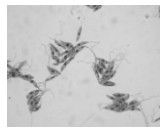
El uso de la teledetección como método para la obtención de información ofrece una serie de ventajas como son la posibilidad de utilizar numerosos sensores con un amplio rango de resoluciones, y cobertura global con bajo o ningún coste (King et al., 2004). Aunque las mediciones a través de satélites u otras técnicas de teledetección no pueden identificar a los propios vectores de enfermedades, sí pueden usarse para la caracterización del medio ambiente en el que éstos viven, y tienen la ventaja de poder realizarse repetida y automáticamente de una manera más sencilla que en los trabajos de campo (Kalluri et al., 2007). Esto hace que el uso de SIG en estudios epidemiológicos se considere una herramienta útil para el cotejo, exploración, visualización y análisis de datos en sanidad, de una manera espacial. La integración de datos medioambientales de teledetección en una plataforma SIG puede ayudar a una mejor comprensión de las dinámicas espacio-temporales de un



amplio rango de enfermedades transmitidas por vectores, y permitir el acceso de los no especialistas a la información epidemiológica de éstas (Stensgaard et al., 2009).

Además, estos estudios no sólo tienen el potencial de observar la situación actual de una enfermedad, sino que también son capaces de realizar predicciones de lo que podría pasar en un futuro dependiendo de la variación que sufran las variables que conforman el modelo generado (González et al., 2010; Fischer et al., 2010; Gálvez et al., 2011). El hecho de poder predecir cuales van a ser las zonas que presenten un mayor riesgo de enfermedad, hace que los programas de control se puedan enfocar a estas zonas más propensas y ser más precisos, por lo que la eficiencia en tiempo y costo se puede mejorar sustancialmente (Fischer et al., 2011).

Entre los principales beneficios que aporta la utilización de la tecnología SIG está el hecho de que la presencia de una referencia geográfica permite incorporar relaciones espaciales a los análisis de datos, a la vez que posibilita la unión de otros datos georeferenciados a los ya obtenidos, haciendo que estos análisis puedan ser más completos. Para tal fin, los programas informáticos SIG son capaces de manejar información georeferenciada presentes en bases de datos, a la vez que se encuentran complementados con una serie de herramientas que facilitan la entrada, manejo y análisis de estos datos, y permiten la producción de mapas y resultados relacionados. Estos mapas se considera que son un método más expresivo y visual en la presentación de resultados, a la vez que permiten la integración espacial de datos epidemiológicos y medioambientales. La información aportada con los mapas de riesgo basados en SIG, puede facilitar la toma de decisiones en los programas de control de las enfermedades y permitiría anticiparse a los incrementos de transmisión y potenciales epidemias en áreas anteriormente no endémicas (Bergquist, 2001; King et al., 2004; Pfeiffer et al., 2008; Fischer et al., 2011). Además la automatización del procesamiento de los datos proporcionados por los satélites, podrían conducirnos a la generación de mapas de riesgo a tiempo casi real que servirían de apoyo a los servicios de sanidad local (Kalluri et al., 2007).



Por lo tanto, se podría decir que la utilización de los SIG, como medio para representar el ambiente de un suceso concreto, puede beneficiar enormemente a las investigaciones llevadas a cabo para describir y entender los procesos que afectan a la ocurrencia de una enfermedad, aunque debido a que estos procesos son muy complejos en la naturaleza, estas representaciones digitales son abstracciones que implican una simplificación y generalización de la realidad. Aún así, los modelos generados tienen el potencial de ayudar a la toma de decisiones más eficientes para el control de enfermedades, abriendo muchas posibilidades en el campo de la investigación (Pfeiffer et al., 2008). También cabe mencionar que esta tecnología va evolucionando continuamente a través del avance del hardware y software, el desarrollo y mejora de los algoritmos analíticos, y la disponibilidad de multitud de bases de datos, muchas de las cuales están georreferenciadas. Además, de forma continua va aumentando la disponibilidad de estas bases de datos georreferenciadas, y el precio de éstas va decreciendo, por lo que hay una mayor facilidad para la obtención de información espacial completa y actual que permita el desarrollo de estudios más fiables.

En resumen, debido a su inherente capacidad de manejar información espacial y no espacial, los SIG proporcionan un marco excelente para observar, estudiar y analizar la situación de los vectores de las principales enfermedades de transmisión vectorial, permitiendo la unión de datos epidemiológicos y medioambientales para la realización de análisis estadísticos espaciales y mapas, tal y como muestran algunos estudios realizados sobre diversas enfermedades de transmisión vectorial (Mortarino et al., 2008; Eisen and Lozano-Fuentes, 2009; Srivastava et al., 2009; Chang et al., 2009; Galvez et al., 2011, etc...).

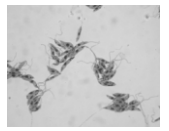
1.10.3. Inconvenientes de la aplicación de los SIG

A pesar de los importantes beneficios que aporta el uso de la tecnología SIG, esta metodología también presenta una serie de limitaciones. Una de ellas es



infravalorar todas aquellas variables que no pueden recogerse mediante este sistema y que pueden tener importancia en la epidemiología de las enfermedades o la de sus vectores, por lo que se ha de encontrar el mejor método para representar estas variables más eficientemente. Además, según Stensgaard et al. (2009), aunque el software de SIG es una importante herramienta para entender los factores espaciales y temporales investigando los enlaces entre las enfermedades y el medio ambiente en el que se encuentran, para el mundo subdesarrollado se tratan de unas herramientas caras y complejas. Por otro lado, estas zonas económicamente deprimidas carecen en su mayoría de imágenes de satélite en alta resolución en áreas no urbanas, por lo que es difícil el estudio de las enfermedades de estas zonas mediante SIG. Otro problema que presenta esta metodología es la homogeneización y comparación de los trabajos realizados ya que al haber distintos paquetes informáticos SIG, no todos los estudios utilizan el mismo, por lo que la comparación de resultados se vuelve más compleja.

Otra limitación que cabe destacar en estos estudios, son los errores que se pueden producir en la predicción de los modelos generados debido en gran parte a la calidad de las capas utilizadas y a las decisiones equívocas a la hora de agrupar datos. Estos errores están ocasionados principalmente por la resolución de los datos incluidos en las capas utilizadas así como una incorrecta agrupación de datos durante el análisis estadístico. Un error en cualquiera de estos factores pueden afectar a la fiabilidad del modelo generado (King et al., 2004; Cecchi et al., 2008). Para minimizar este tipo de error se han de conseguir las capas con mayor resolución posible y realizar las agrupaciones de datos atendiendo a criterios de significación estadística y siempre teniendo en cuenta un conocimiento previo de las posibilidades de agrupación. Además, dentro de los factores determinantes de una enfermedad también se incluyen variables no ecológicas explicativas que no pueden ser tenidas en cuenta en estos modelos estadísticos, como son el cambio en el comportamiento humano y la calidad del alojamiento, y éstas pueden afectar al valor predictivo del



modelo. Un hecho similar fue sugerido por Elnaiem et al. (2003) en un estudio realizado sobre *P. orientalis*, en el que mencionan que este tipo de mapas están limitados a describir potenciales áreas de transmisión si solo se usan datos espaciales y medioambientales, ya que la aparición de casos de leishmaniosis visceral también depende de otros factores difíciles de incluir en los modelos, como presencia de poblaciones humanas susceptibles, el parásito, y hospedadores o reservorios.

Por lo tanto, cuando se aplican métodos de análisis espacial como parte de la gestión de una enfermedad, en lugar de como una herramienta de investigación, las conclusiones deben tomarse con precaución, principalmente debido a los posibles errores potenciales y sesgos realizados durante la creación del modelo. Para poder prevenir la posible mala interpretación y poder corregir los errores durante la construcción del modelo, las estimaciones de riesgo obtenidas por esta metodología deben estar acompañadas por declaraciones explícitas acerca de sus posibles errores y de la influencia de los sesgos que se han podido cometer (González et al., 2010). A la hora de obtener conclusiones sobre el control de una determinada patología, también se han de tener en cuenta factores políticos y valores sociales que pueden chocar frontalmente con las propuestas de control realizadas (Pfeiffer et al., 2008).

1.11. Cambio climático y variables medioambientales

En los últimos años se ha mencionado en repetidas ocasiones la importancia del cambio climático (Martín Vide et al., 2007) y de su posible repercusión en la distribución de los principales vectores, y de las enfermedades transmitidas por éstos (de La Rocque et al., 2008; Reiter et al., 2008; Ready, 2008). Alteraciones en la temperatura, radiación solar, humedad y precipitaciones, pueden afectar a la biología y ecología de los vectores, y hospedadores intermediarios, influyendo por lo tanto en el riesgo de transmisión de las enfermedades de las que son portadores (Githeko et al., 2000; Semenza y Menne, 2009). Precisamente para predecir el efecto del cambio climático, o simplemente observar el efecto del medioambiente en la distribución de

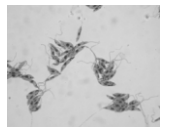


las enfermedades, de sus hospedadores y de sus vectores, está generalizado el estudio de las variables medioambientales que podrían afectar a esta distribución, principalmente mediante los SIG.

1.11.1. Cambio climático

El calentamiento global es un hecho constatado debido a que en Europa se ha detectado un aumento de 0'8°C en la temperatura media anual en los últimos 100 años (Semenza y Menne, 2009). Este calentamiento se ha relacionado con potenciales impactos directos en salud humana y animal debido a que podría producir efectos notables en los ecosistemas, así como en la distribución de plantas y animales. Si esta tendencia continua se podría producir una reducción de la mortalidad de los vectores de enfermedades durante el invierno y un aumento de su periodo de actividad, y se podrían establecer nuevas áreas de transmisión por la expansión de sus zonas de ocupación. Estos cambios en la climatología pueden influir tanto a factores propios de las especies vectoras (aumento de las tasas de alimentación, de reproducción y de proliferación, aumento del periodo de actividad, etc...) como a factores ambientales que pueden afectar de manera indirecta a la distribución de estos vectores y permitir la ocupación de zonas en las que antes no estaban presentes (presencia y distribución de hospedadores y sus patrones de exposición a los vectores, cambios en la vegetación, etc...) (Lindgren et al., 2004; Semenza y Menne, 2009). Pero estos cambios no siempre son beneficiosos, y determinadas especies pueden desaparecer de algunas ubicaciones de forma permanente o en determinadas épocas del año.

Sin embargo, el clima se considera que es sólo uno de los muchos factores que pueden afectar a la distribución de los vectores. Aspectos como la destrucción del hábitat, el uso del terreno, la aplicación de insecticidas, la migración y densidad de hospedadores, o el desarrollo socioeconómico de la zona, pueden llegar a ser incluso más importantes que el cambio climático, aunque su cuantificación es difícil. Además,



la utilización de medidas personales tales como el uso de mosquiteras, repelentes personales o en viviendas, aire acondicionado, etc., reducen el riesgo de transmisión de las enfermedades vectoriales, y son difícilmente cuantificables. Por esta razón, se considera que los datos obtenidos en la actualidad no demuestran de forma concluyente que el cambio climático actual haya producido por sí mismo un incremento en la incidencia de las enfermedades transmitidas por vectores a nivel europeo (Semenza y Menne, 2009; López-Vélez y Molina, 2005).

En el caso de la leishmaniosis, se considera que la acción humana unida al cambio climático puede conducir a la dispersión, difusión, amplificación, persistencia o reducción de la leishmaniosis en los nuevos entornos, siendo importante en el proceso de dispersión el comercio mundial de mercancías, personas y animales (Fischer et al., 2011; de la Rocque y Rioux, 2008; López-Vélez y Molina, 2005).

En esta parasitosis, los artículos publicados tampoco demuestran que el cambio climático por sí mismo haya causado una alteración en la distribución de los flebotomos y de la leishmaniosis, aunque su potencial efecto sobre esta enfermedad no se puede descartar (Semenza y Menne, 2009; Salomón et al 2012). En las distintas publicaciones que relacionan a la leishmaniosis con el cambio climático, se pone de manifiesto la necesidad de que la leishmaniosis sea monitorizada y así poder prevenir el riesgo existente de que se produzca la expansión geográfica y la variación de incidencia de esta enfermedad, principalmente por la diseminación, abundancia y diversidad de vectores competentes (Salomón et al., 2012).

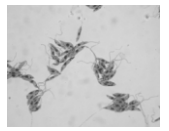
A este respecto, varios autores consideran que el calentamiento global podría ser una de las principales causas de la expansión de especies vectoras, lo que podría ocasionar que los parásitos de las que son portadoras también sufran esta expansión (Aspöck, 2008; Aspöck et al., 2008; Salomón et al., 2012). Según Cross y Hyams (1996) en el sudoeste de Asia, un incremento de 1°C aumentaría un 14% las zonas endémicas de leishmaniosis. Si el incremento fuera de 3°C habría que añadir un 15%



más, y además el periodo de transmisión de la enfermedad sería durante todo el año en el 7% de las localizaciones. Peterson y Shaw (2003) observaron en Sudamérica que un incremento en la temperatura tendría un mayor efecto sobre la dispersión de los hospedadores de la leishmaniosis que si se incluyen exclusivamente datos topográficos. Según la tendencia climática actual, González et al. (2010) predijeron que en Estados Unidos, hacia el 2080, podrían estar expuestas a la transmisión de la leishmaniosis por su vector el doble de personas, aún en el caso de que sólo se produjera el 10% de ocupación de hábitats favorables.

En Europa también se han realizado distintas hipótesis sobre la posible expansión de las especies de flebotomo vectoras desde zonas endémicas del sur hacia el norte (Aspöck et al., 2008; Fischer et al., 2010; Fischer et al., 2011). Esta hipótesis sobre la posible expansión que pueden estar sufriendo los flebotomos puede estar apoyada por la descripción de los primeros casos de leishmaniosis autóctona del centro de Europa (Bogdan et al., 2001; Koehler et al., 2002; Müller et al., 2009), y por las primeras capturas de flebotomos también en la región centroeuropea (*P. mascitti* en Austria, Bélgica y Alemania, y *P. perniciosus* en Alemania) (Naucke y Pesson, 2000; Depaquit et al., 2005; Naucke et al., 2008; Naucke et al., 2011).

En el caso concreto de España, Morales-Yuste (2012) encontró que la temperatura había aumentado en los últimos 25 años y que se había producido un aumento del periodo de actividad de *P. perniciosus* en el sureste peninsular, hecho que podría estar a favor de la influencia del calentamiento global sobre los flebotomos vectores, aunque también observó que la densidad y abundancia de estos dípteros no había aumentado. En esta misma región, Martín-Sánchez et al. (2009), observaron que la seroprevalencia canina de *L. infantum* había aumentado, posiblemente provocado por este aumento de actividad de *P. perniciosus*. A su vez, López-Vélez y Molina (2005) mencionaron que un aumento de la temperatura, producida por el cambio climático, podría desplazar las especies vectoras de *L.*



infantum hacia el norte de la Península Ibérica, tradicionalmente considerada como no endémica, y aumentar el riesgo de que *L. tropica* pueda emerger en el sur de Europa por su expansión desde el Norte de África. Recientemente se ha observado la existencia de focos con alta prevalencia de leishmaniosis canina en el Noroeste peninsular (Miró et al., 2012), lo que podría ser considerado un indicio de que se esté produciendo esta expansión. A pesar de estos datos son necesarios más estudios para determinar si realmente se está produciendo o no esta expansión, y si el cambio climático es o no el principal responsable.

Desde finales del 2004 hasta finales del 2010, la Unión Europea subvencionó la red europea EDEN (Emerging Diseases in a changing European eNvironment). Esta red tenía la finalidad de identificar, evaluar y catalogar los ecosistemas y condiciones ambientales europeas ligadas al cambio global que pudieran influir en la distribución espacial y temporal, y en las dinámicas de los agentes patógenos (López-Vélez y Molina, 2005). Entre estas enfermedades estaba incluida la leishmaniosis. Cabe mencionar que parte de la presente tesis se ha realizado de acuerdo con los procedimientos establecidos por esta red europea.

1.11.2. Variables medioambientales usadas en epidemiología

Hay bastantes variables medioambientales que pueden ser usadas en epidemiología. En la leishmaniosis, los estudios epidemiológicos se centran principalmente en la distribución de su vector, de sus reservorios o de los casos humanos. En el caso de los vectores son muchos los aspectos ambientales que pueden influir en su distribución. La recogida de estas variables puede ser realizada de dos maneras principales: mediante observación y anotación en el campo, o mediante la utilización de los SIG. La recogida de datos en el campo se puede realizar mediante anotación en los lugares donde se van a realizar los muestreos o recogidas de datos, y posteriormente realizar de forma manual una base de datos, o realizar la anotación de estas observaciones mediante la utilización de una PDA (Personal Digital

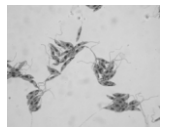


Assistant), que puede generar la base de datos automáticamente. Para obtener la información de las variables mediante SIG es imprescindible una localización geográfica precisa de los lugares sometidos a estudio. A continuación vamos a enumerar algunas de las variables ambientales más frecuentes recogidas para los estudios epidemiológicos de los flebotomos vectores.

1.11.2.1. Variables medioambientales recogidas mediante SIG

Estas variables suelen estar recogidas en mapas o capas SIG. Tal y como ya se ha comentado anteriormente, para la obtención de información de lugares concretos mediante esta vía es imprescindible su localización exacta para así poder extraer los datos de los mapas SIG. A continuación mostramos algunas de las capas más frecuentemente utilizadas en epidemiología y que han sido mencionadas en distintos estudios.

Temperatura de la superficie terrestre (LST): La obtención de estos datos de temperatura se realiza mediante detección por satélite y posterior obtención de la capa SIG mediante una serie de complejos procesos (Weng et al., 2004). Como ya ha quedado de manifiesto en el apartado de Cambio Climático, la temperatura es un factor muy importante en la biología y distribución de las enfermedades transmitidas por vectores. Un aumento en la temperatura puede acortar el ciclo del parásito en el vector, reducir el periodo de diapausa invernal de este vector, y cambiar su distribución geográfica (López-Vélez y Molina, 2005). Se considera que el límite inferior de tolerancia de los flebotomos en Europa está en 10°C de temperatura media anual, y que estos dípteros requieren una temperatura media mensual de al menos 20°C durante el mes más cálido (Fisher et al., 2010). Un ejemplo de la influencia de esta variable fue mencionado por Thompson et al. (1999) en Sudán. Estos autores encontraron que dentro de los determinantes ecológicos más importantes para la distribución de *P. orientalis* estaba la temperatura media.



Diferencia Normalizada del Índice de Vegetación (NDVI): Las medidas de esta variable se realizan mediante satélite, y es una función de la reflectancia de las cubiertas vegetales en los espectros visible e infrarrojo, la reflectancia del suelo en los mismos espectros y la reflectancia atmosférica (Weng et al., 2004). Se utiliza normalmente para la observación y comparación de la densidad de vegetación presente en distintas zonas. Elnaiem et al. (2003) pusieron de manifiesto la influencia de esta variable sobre la leishmaniosis visceral en Sudán, y Bhunia et al. (2010) en la India, de manera que bajos valores de NDVI (escasez de vegetación) producían una mayor incidencia de la enfermedad. Esto se puede deber principalmente a la influencia sobre sus vectores. A este respecto, Thomson et al. (1999) encontraron que el uso del NDVI para la clasificación del tipo de suelo, estaba correlacionado con la presencia de *P. orientalis* en Sudán.

Altitud (Modelo Digital del Terreno): La altitud de un determinado lugar puede ser recogida mediante altímetro, mapas de curvas, GPS o el uso de Modelos Digitales del Terreno. Los Modelos Digitales del Terreno son mapas SIG en los que todos sus puntos llevan asociados datos de altitud, entre otra información (orientación, pendiente, etc...). Se considera que un cambio en altitud está asociado a un cambio de clima y de vegetación (Salomón et al., 2012). Conforme la altitud es mayor la vegetación cambia y desciende la temperatura con un gradiente de $-0'6^{\circ}\text{C}$ por cada 100 metros de altitud que aumentamos (Rivas-Martínez et al., 1987). Algunos estudios han puesto de manifiesto la influencia de la altitud como parámetro para la distribución de distintas especies de flebotomo y sus densidades (Guernaoui et al., 2006; Galvez et al., 2011). En algunos lugares como la India o Sudán, se ha observado que la leishmaniosis visceral se da principalmente a bajas altitudes (Bhunja et al., 2010; Elnaiem et al., 2003), aunque en España son frecuentes los casos de leishmaniosis por encima de 800 metros (Morillas-Márquez et al., 2010).

Uso del Terreno (Corine): La monitorización del uso del terreno (landuse) mediante el uso de las nuevas tecnologías basadas en SIG, ha permitido desarrollar



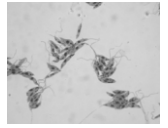
métodos para una rápida estratificación de áreas propensas a mostrar un alto riesgo a ciertas enfermedades. En un estudio realizado anteriormente con *P. orientalis* el modelo de regresión logística generado indicó que entre los mayores determinantes de esta especie estaba el tipo de suelo (Thomson et al, 1999). Otros estudios en los que también se ha podido determinar que efectivamente el uso del terreno o la cobertura del terreno influyen en la distribución de los vectores de enfermedades son: Cecchi et al. (2008); Sudhakar et al. (2006); King et al. (2004); Claborn et al. (2008); Bhunia et al. (2009).

1.11.2.2. Variables medioambientales recogidas en el campo

Estas variables se centran principalmente en la observación y anotación de las características ambientales de los lugares en los que se van a realizar las capturas. Entre las anotaciones más frecuentes que se suelen realizar se encuentran las siguientes:

Humedad relativa: Este dato se suele recoger mediante higrómetro, aunque también es posible obtenerlo mediante SIG o a través de los datos recogidos en estaciones meteorológicas. Se considera que las especies de flebotomo difieren en sus requerimientos de humedad (Lindgren y Naucke, 2008). Algunas especies de flebotomo se suelen encontrar con mayor frecuencia en ambientes con una mayor humedad relativa, por ejemplo *P. aiasi*, que suele tener densidades máximas asociadas a climas húmedos y frescos, aunque también está presente en zonas secas (Martínez-Ortega, 1986; Rioux et al., 1986b).

Temperatura: Este dato se recoge mediante termómetro. Se suele medir tanto la temperatura ambiental, como la temperatura del microhabitat en el que se va a realizar el muestreo (ej: interior de las barbacanas). Como se ha podido observar en el apartado de cambio climático, es uno de los factores más importantes en la distribución y biología de los vectores.



Protección: Observación de la protección contra el viento que presenta el lugar donde se va a realizar el muestreo. El desplazamiento de los flebotomos se ve afectado negativamente por la acción del viento, por lo que lugares protegidos frente a éste pueden facilitar su captura (Gil Collado et al., 1989; Killick-Kendich, 1990). Gálvez et al. (2010a) encontraron en Madrid que las mayores densidades de flebotomos se encontraban en los lugares protegidos del viento.

Cursos de agua: El hecho de que haya o no cursos de agua cercanos puede modificar los valores de humedad relativa y favorecer la presencia de determinadas especies. En Irak se ha observado que las larvas de *P. sergenti* se ven favorecidas por la presencia de zonas ricas en agua como canales de irrigación o de agua de drenaje urbano (Lewis, 1971).

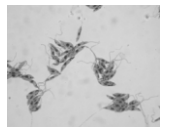
Vegetación y cobertura del terreno circundante: El tipo de vegetación que rodea a las estaciones de muestreo puede ser importante para la presencia de las distintas especies de flebotomos, ya que puede modificar las características ecológicas presentes. El hecho de que haya un tipo de vegetación u otra, puede provocar variaciones en la humedad y temperatura. Además se ha visto que algunas especies de flebotomo se ven favorecidas por la presencia de determinadas especies vegetales. Un ejemplo de esta relación es el caso de *P. orientalis* en Sudán, en el que se ha visto que su distribución está determinada por el tipo de suelo y por la presencia de bosques de *Acacia-Balanites* (Thompson et al, 1999). En el caso contrario estarían la Buganvilla y Solanum, en las que se ha observado que ejercen un efecto negativo sobre *P. papatasi* en Israel (Schlein et al., 2001). La presencia de cultivos, urbanizaciones, vegetación natural, superficies pavimentadas, etc... alrededor de las estaciones de muestreo, también puede afectar a la presencia de unas especies u otras. Por ejemplo, especies antropofílicas como *P. papatasi* y *P. alexandri* tienen una mayor afinidad por los ambientes urbanos en oriente medio (Colacicco-Mayhugh et al., 2010).



1.12. Estudios moleculares intraespecíficos en flebotomos

El conocimiento de la biogeografía y de las relaciones genéticas entre las distintas poblaciones de flebotomos puede permitir una mejor comprensión de la epidemiología de la leishmaniosis. Además, la existencia de razas o de especies hermanas, sólo identificables mediante métodos moleculares, podría también influir en la capacidad vectorial de las distintas especies de flebotomo. Por esta razón, el estudio intraespecífico de estas especies puede ayudarnos a establecer la diversidad genética de estas poblaciones y analizar sus implicaciones epidemiológicas. Algunas técnicas usadas para conocer la estructura de las poblaciones son el análisis de los hidrocarburos cuticulares, técnicas isoenzimáticas y RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) (Kamhawi et al., 1987; Pesson et al., 1991; Martín-Sánchez et al., 2000). Las isoenzimas son proteínas que a pesar de catalizar la misma reacción química, difieren en la secuencia de aminoácidos y por tanto de peso molecular y/o carga eléctrica, lo que se traduce en una diferente movilidad al someterlas a electroforesis. Una vez realizada la migración, aprovechando la capacidad catalítica de las enzimas, podemos proceder a su revelado, obteniéndose un conjunto de bandas denominado zimograma. La técnica RAPD muestra la variabilidad de un gran número de loci anónimos, teóricamente distribuidos a través de todo el genoma del parásito, lo cual posibilita la determinación de un elevado número de marcadores genéticos útiles para el estudio de poblaciones, ya que la mayoría de ellos son polimórficos. El resultado de esta técnica es la generación de un patrón de bandas, que traducido a datos de presencia/ausencia de bandas en los distintos individuos, permite la utilización de técnicas taxonómicas o filogenéticas (Martín-Sánchez et al., 2000; Dvorak et al., 2011). En general, estas técnicas cuticulares, isoenzimáticas y de RAPD han sido sustituidas más recientemente por los análisis comparativos de las secuencias de bases de diversos genes o fragmentos de ellos.

Una de las técnicas más extendidas en genética de poblaciones es el análisis de marcadores genéticos situados en el ADN mitocondrial (ADNm) o el ADN ribosomal



(ADNr) (Esseghir et al., 1997; Pesson et al., 2004; Depaquit et al., 2002; Hamarsheh et al., 2007; Dvorak et al., 2011). El ADNr es una secuencia de ADN que codifica el ARN ribosómico y que regula la transcripción e iniciación de la amplificación. Este ADNr contiene segmentos espaciadores transcribibles externos (ETS) e internos (ITS), y no transcribibles (NTS). Aunque puede ser usado para estudios intraespecíficos (principalmente las secuencias de ITS), debido al bajo nivel de polimorfismo en la unidad de transcripción del ADNr, es también útil para la comparación interespecífica (Di Muccio et al., 2000). El ADN mitocondrial (ADNm) es una estructura circular, relativamente conservada, que al tener una alta tasa evolutiva (con respecto a los genes nucleares) lo convierte en un marcador genético útil para el estudio de genética de poblaciones intraespecíficas y estudios filogenéticos. Además, al ser el ADNm de herencia materna, los genes mitocondriales representan loci genéticamente independientes de los genes del núcleo, cuya herencia parental implica recombinación genética.

Estas técnicas moleculares de comparación de secuencias se basan principalmente en la amplificación de ADN por PCR (PCR=Polimerase Chain Reaction) directa o por clonación, secuenciación del amplificado para la obtención de las secuencias de nucleótidos, alineamiento de estas secuencias, y posterior análisis taxonómico o filogenético mediante el uso de programas informáticos específicos.

1.12.1. Uso de la filogenia en los estudios moleculares

La reconstrucción filogenética es el proceso por el cual obtenemos una hipótesis sobre las relaciones genealógicas o evolutivas entre varios organismos en forma de árbol filogenético o filogenia (Melic et al., 1999). El objetivo de la filogenia consiste en trazar la relación entre los ancestros y descendientes de los organismos teniendo en cuenta diversos caracteres homólogos, tanto morfológicos, biológicos, fisiológicos y moleculares, estableciendo diferentes niveles taxonómicos. Los árboles filogenéticos surgen a partir de la teoría de que todos los seres orgánicos provienen



del mismo ancestro común que se han diversificado evolutivamente a lo largo del tiempo. Tradicionalmente los árboles eran contruidos de acuerdo con caracteres morfológicos, pero debido a su implementación en ordenadores y a la utilización de las secuencias de nucleótidos, han aparecido otras metodologías filogenéticas (Arnedo, 1999). Además, las filogenias basadas exclusivamente en caracteres morfológicos tenían poca resolución o eran muchas veces incorrectas. Actualmente la mayoría de las filogenias se construyen sobre marcadores genéticos, especialmente secuencias de ADN. Las deducciones de los estudios filogenéticos se suele representar mediante árboles filogenéticos que son estructuras matemáticas usadas para representar la historia evolutiva (relaciones de ancestro-descendiente) entre un grupo de secuencias u organismos. Dicho patrón de relaciones históricas es la estima hecha de la filogenia o árbol evolutivo.

El procedimiento para elaborar el árbol filogenético se divide en cinco etapas principales:

- Selección de marcadores moleculares.
- Alineamiento múltiple de las secuencias.
- Elección de un modelo evolutivo.
- Determinación de un método de construcción de árboles.
- Verificación de la fiabilidad del árbol construido.

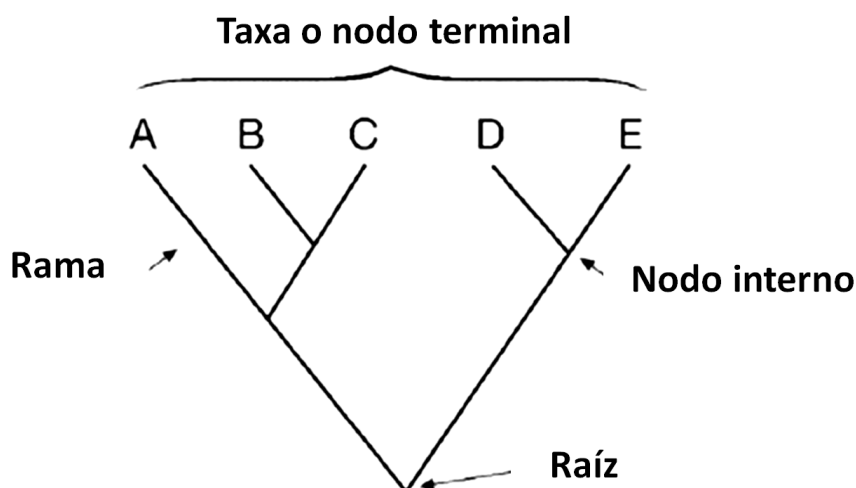
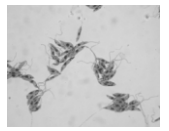


Figura 55. Representación de un árbol filogenético con algunos términos de nomenclatura.



Como método para evaluar la calidad de los árboles filogenéticos generados se utiliza el bootstrap, que es un test estadístico que determina los límites de confianza de las ramas internas de estos árboles. Estos límites de confianza se estiman como el porcentaje de pseudorréplicas construidas mediante bootstrap. Las pseudorréplicas de secuencias de ADN se consiguen mediante la creación de nuevas secuencias con la misma longitud, en las que los nucleótidos han sido remuestreados con reemplazamiento, de manera que algunos estarán repetidos una o más veces y otros estarán ausentes. Por lo tanto el apoyo de una rama determinada será el porcentaje de veces que el clado que define aparece en el conjunto de árboles de la pseudorréplica (proporción bootstrap). Para poder obtener y representar este valor es necesario obtener un árbol consenso, cuya función es la de representar gráficamente los puntos de acuerdo entre los distintos árboles fundamentales (árboles resultantes del análisis filogenético de las pseudorréplicas) (Arnedo, 1999).

Algunos de los principales métodos filogenéticos usados son los análisis basados en matrices de distancias (UPGMA y Neighbor-Joining), los análisis de parsimonia, y los análisis de máxima verosimilitud. Estos métodos pueden dividirse en dos categorías dependiendo de si se basan en caracteres discretos o en distancias. Los métodos basados en caracteres discretos son aquellos que usan directamente las secuencias mientras que los basados en distancia usan matrices de distancia. A su vez, cada una de estas categorías se divide en dos grupos dependiendo de si usan algoritmos de agrupamiento o criterios de optimización para encontrar la topología de los árboles.

	Distancia	Caracteres discretos
Algoritmo de agrupamiento	UPGMA Neighbour-joining	
Criterios de optimización		Máxima Parsimonia Máxima Verosimilitud

Tabla 4. Métodos de reconstrucción filogenética.



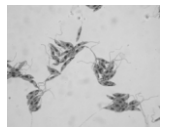
Mediante la definición de un criterio de optimización se comparan muchas topologías entre las distancias estimadas en el árbol y las distancias evolutivas reales, mientras que en los métodos basados en algoritmos de agrupamiento, se calcula el árbol usando la matriz de distancias, empezando por los pares de secuencias más similares.

1.12.2.1. Métodos basados en distancias

Se basan en la premisa de que la distancia entre taxones, utilizada como una medida de sus diferencias, se relaciona directamente con su relación filogenética. Estos métodos transforman los alineamientos de secuencias en una matriz de distancias genéticas en donde cada una de las celdas representa una medida de las diferencias entre los taxones implicados. El siguiente paso consiste en la construcción del árbol filogenético mediante métodos algorítmicos (UPGMA y Neighbor-Joining). Estos métodos basados en matrices de distancias requieren la adopción explícita de un modelo evolutivo (Arnedo, 1999).

A continuación se detallan dos de los principales métodos basados en distancia: UPGMA y Neighbor Joining.

UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average): es el método más simple basado en algoritmos de agrupamiento, y constituye un árbol por un método de agrupamiento secuencial. Este método asume que los taxa son grupos por si mismos, agrupa los dos taxa más cercanos entre sí basándose en la matriz de distancias, y posteriormente crear una matriz reducida considerando al agrupamiento como un único taxón. El mismo proceso de agrupamiento se repite y se crea otra nueva matriz reducida. Este proceso continúa hasta que todos los taxa se colocan en el árbol y están unidos en un solo grupo. El último taxón añadido se considera que es el outgroup, lo que produce un árbol con raíz. Con este método se asume que hay una tasa constante de evolución.



Neighbor-joining (NJ): se producen árboles no enraizados, en los que no hay una tasa constante de evolución entre los linajes. Consiste en agrupar los taxa menos distanciados genéticamente, considerándolos como una sola entidad, y posteriormente se busca el siguiente taxón que tenga la menor distancia con este primer grupo para formar un nuevo agrupamiento. El proceso continúa hasta unir todos los taxa formando un único árbol filogenético. En cada paso del análisis, se van originando nuevas matrices de distancias a partir de la matriz original, de manera que la divergencia entre cada par de nodos se ajusta basándose en la divergencia promedio de ellas con respecto al resto de los taxones.

1.12.2.2. Métodos basados en caracteres discretos

Estos métodos usan directamente las secuencias por lo que consideran cada sitio del alineamiento (o una función probabilística para cada sitio). A diferencia de los métodos de distancias presentan dos pasos lógicos:

- Definir el criterio de optimización (descrito formalmente en una función objetiva) para evaluar cada posible topología, asignándole una puntuación con la que poder comparar cuantitativamente el mérito de cada árbol en base al criterio de optimización.
- Usar algoritmos de búsqueda específicos para calcular el valor de la función de objetividad y para encontrar el/los árbol(es) con la mejor puntuación acorde a este criterio (un valor máximo o mínimo, según el caso).

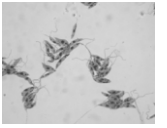
Estos métodos son muchísimo más lentos que los algorítmicos, debido a que tienen que hacer búsquedas en el inmenso espacio de topologías para encontrar la(s) mejor(es). Se trata de métodos puramente algorítmicos, representando una buena aproximación heurística para encontrar el árbol de evolución mínima más corto.

Parsimonia: La asunción básica es que la existencia de compatibilidad entre las agrupaciones derivadas de los caracteres es el resultado de la presencia de



antepasados comunes (Arnedo, 1999). La hipótesis más parsimoniosa es aquella que explica todos los datos con el menor número posible de pasos. En el contexto de una inferencia evolutiva, el árbol más parsimonioso es aquél que requiere los menores cambios evolutivos para explicar las diferencias entre los taxones (Hillis et al., 1993). Se puede obtener más de un árbol parsimonioso, de diferente topología pero igualmente parsimonioso. La parsimonia asume la existencia de una serie de condiciones: independencia de los caracteres, independencia de los taxones (ausencia de hibridación, introgresión o transferencia lateral de información), y tasas similares de cambios a lo largo de las ramas del árbol (Arnedo, 1999). Una ventaja de este método es que lo único necesario para polarizar los caracteres es situar la raíz del árbol. Para hacer esto se han de añadir uno o más taxones externos (outgroups) y situar la raíz en el internodo que separa a estos taxones externos de los taxones a estudiar.

Máxima verosimilitud (MV): El método es probabilístico, evalúa una hipótesis filogenética en términos de la probabilidad de que un determinado modelo evolutivo propuesto haya dado lugar o explique los datos observados (secuencias de nucleótidos) (Huelsenbeck y Crandall, 1997; Swofford et al., 1996). Se basa en que como es imposible conocer cual es la filogenia real de los taxones, lo que se puede hacer es adoptar un criterio que permita evaluar los méritos relativos de los cladogramas (árboles filogenéticos), de forma que la hipótesis elegida es la más congruente en la distribución de las sinapomorfías (caracteres que se originaron en un ancestro común y son compartidos por todo el grupo desarrollado a partir de él), las cuales constituyen los test de falsificación de la hipótesis (Arnedo, 1999). Este método necesita adoptar un determinado modelo evolutivo, que en el mejor de los casos representa una simplificación de la realidad. El análisis consiste pues en hallar el árbol o árboles que presenten una mayor verosimilitud, teniendo en cuenta la ramificación, longitud de las ramas y la estimación de parte de los parámetros del modelo adoptado. Por lo tanto, la filogenia bajo este método se puede considerar



como un problema de selección de modelos. Trata de encontrar la estimación de los valores de cada parámetro del modelo y luego comparar las verosimilitudes de los distintos modelos, escogiendo la topología con la mejor verosimilitud.





2. **OBJETIVOS**





2. OBJETIVOS

En el presente trabajo se han perseguido dos objetivos generales: el estudio de las poblaciones de flebotomos presentes en el sureste de España, prestando especial atención al análisis cuali-cuantitativo y molecular de los principales vectores de *Leishmania infantum* (*P. perniciosus* y *P. ariasi*) y *Leishmania tropica* (*P. sergenti*); y la determinación de los parámetros que condicionan la distribución de algunas de estas especies vectoras, para la construcción de mapas de riesgo que nos permitan enfocar posibles medidas de control de la leishmaniosis a partir de las características epidemiológicas de su vector. Para la consecución de estos objetivos generales, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- 1- Determinar la composición específica y abundancia relativa de las poblaciones de flebotomos en el sudeste de España, e identificar las características ecológicas asociadas a su presencia, con especial atención a los principales vectores de *L. infantum* y *L. tropica*.
- 2- Estudiar la variación molecular de las poblaciones españolas de *Phlebotomus sergenti* y su comparación con otras procedentes de Marruecos, a través del análisis comparativo de fragmentos del gen Citocromo b (Cyt b) del ADN mitocondrial (ADNm), y del Espaciador Transcrito Interno (ITS-2) del ADN ribosómico (ADNr).
- 3- Estudiar la secuencia del gen Citocromo b (ADNm) de las poblaciones españolas de *P. ariasi* para observar su diversidad genética y analizar las posibles implicaciones epidemiológicas de esta variabilidad.
- 4- Construir mapas predictivos de exposición a *P. perniciosus*, que nos ayuden a predecir el riesgo de leishmaniosis canina y a definir medidas de control de esta enfermedad.
- 5- Construir mapas de riesgo de exposición a *P. sergenti* que nos ayuden a identificar los posibles “puntos calientes” para el potencial establecimiento de *Leishmania tropica* en el suroeste de Europa.





3. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS





3.1. **Artículo 1:** Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco.

Variabilidad intraespecífica (ITS de ADNr y Cyt b de ADNm) de *Phlebotomus sergenti* en España y Marruecos.

Barón S., Martín-Sánchez J., Gállego M., Morales-Yuste M., Boussa S., Morillas-Márquez F.

Acta Tropica (2008); 107(3): 259-67.

Factor de Impacto: Año de publicación - 1'707 2º cuartil (6/15 en Tropical Medicine).

Actual – 2'787 1^{er} cuartil (4/22 en Tropical Medicine).

Resumen: *Phlebotomus sergenti*, el principal vector de *Leishmania tropica*, está ampliamente representado en España, mientras que *L. tropica* no es una especie endémica en este país. Sin embargo, el importante flujo migratorio humano desde las regiones donde es endémica *L. tropica*, la existencia de su vector y el ciclo antroponótico del parásito podría conducir a su establecimiento en nuestro país. La capacidad vectorial de *P. sergenti* podría depender de la existencia de especies crípticas o razas, que sólo pueden ser identificados por métodos moleculares. Nuestro objetivo ha sido estudiar la variación molecular en dos genes de las poblaciones españolas de *P. sergenti*, comparándolos con los marroquíes. Hemos identificado cinco haplotipos ribosomales y 16 mitocondriales. Los resultados obtenidos indican una alta diversidad de *P. sergenti* en España y la existencia en el país de dos linajes de *P. sergenti*, un linaje mitocondrial típicamente español y otro común con Marruecos, donde *L. tropica* es endémica en el sur y emergente en el norte y centro del país.





Acta Tropica 107 (2008) 259–267



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt *b*) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco

S. Barón^a, J. Martín-Sánchez^{a,*}, M. Gállego^b, M. Morales-Yuste^a,
S. Boussaa^c, F. Morillas-Márquez^a

^a Dpto Parasitología, Fac. Farmacia, Univ. Granada, Granada, Spain

^b Lab. Parasitología, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona, Barcelona, Spain

^c Laboratoire d'Ecologie Animale, Fac. Sciences Semlalia, Univ. Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2007

Received in revised form 23 June 2008

Accepted 12 July 2008

Available online 23 July 2008

Keywords:

Phlebotomus sergenti

Leishmania tropica

Mitochondrial haplotypes

Cyt *b*

Ribosomal haplotypes

ITS2

ABSTRACT

Phlebotomus sergenti, the main vector of *Leishmania tropica*, is widely represented in Spain, whilst *L. tropica* is not an endemic species in this country. Nevertheless, the important human migratory flow from regions where *L. tropica* is endemic, the existence of its vector and the anthroponotic cycle of the parasite could lead to its establishment in our country. The vectorial capacity of *P. sergenti* could depend on the existence of cryptic species or races, which can only be identified by molecular methods. Our aim has been to study the molecular variation on two genes of Spanish populations of *P. sergenti*, comparing them with Moroccan ones. We have identified 5 ribosomal and 16 mitochondrial haplotypes. The results obtained indicate a high diversity of *P. sergenti* in Spain and the existence in the country of two *P. sergenti* lineages, a typically Spanish mitochondrial lineage and another one common in Morocco, where *L. tropica* is endemic in the south and emergent in the north and centre of the country.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phlebotomus (*Paraphlebotomus*) *sergenti* Parrot, 1917 is the main vector of *Leishmania tropica* (Wright, 1903), responsible for the anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) (Al-Zahrani et al., 1988; Guilvard et al., 1991). It has an extensive geographical distribution, wider than that of the flagellate (Depaquit et al., 2002). It has been suggested that the presence of this sandfly in *L. tropica* free areas and the differences in the transmission patterns of the ACL could be related to the existence of races or even cryptic vector species (Depaquit et al., 2002; Yahia et al., 2004). *Phlebotomus sergenti* is a species widely present in Spain (Gil Collado et al., 1989). In Spain it shows a biphasic phenology in localities with optimal climatology for its development, with two maxima located at the beginning and at the end of the summer period, that are separated by a minimum in the month of August (Martínez Ortega and Conesa Gallego, 1987; Sanchís-Marín et al., 1986), similar to the phenology of this species in Morocco (Guernaoui et al., 2005; Guessous-Idrissi et al., 1997). Conversely, *L. tropica* is not an endemic species in Spain, where only *Leishmania infantum* has this

trait (Gállego et al., 2002; Martín-Sánchez et al., 2004). Nevertheless (i) the important human migratory flow from areas where this parasitosis is endemic, (ii) the existence of the vector and (iii) the anthroponotic cycle of the parasite, could lead to its establishment in Spain, in a similar way to what has happened in the north of Morocco (Guessous-Idrissi et al., 1997; Rhajaoui et al., 2004). Bearing in mind that the vectorial capacity of *P. sergenti* could depend on the existence of races or even sibling species, which can be identified only by molecular methods, our aim has been to study the molecular variation of Spanish *P. sergenti* populations, comparing them with Moroccan ones. For that reason, we have selected two genes with a high mutation rate and a different type of heredity, such as are the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of the ribosomal DNA (rDNA) and a fragment of the gene Cytochrome *b* (Cyt *b*) of the mitochondrial DNA (mtDNA). In both cases the scientific literature describes primers and conditions for the PCR and with pre-existing knowledge of them in some sandfly species. The ITS2 has provided resolution in several studies at the subgeneric taxonomic level for the *Larrousius* and *Paraphlebotomus* (Depaquit et al., 2000, 2002; Di Muccio et al., 2000). The comparative sequence analysis of mtDNA fragments has been shown to be useful for genetic differentiation of geographical lineages and species on the subgenus *Larrousius*, *Phlebotomus* and *Paraphlebotomus* (Essegir et al., 1997; Moin-Vaziri et al., 2007; Perrotey et al., 2005; Pesson et al., 2004; Yahia et al., 2004).

* Corresponding author at: Dpto Parasitología, Fac. Farmacia, Campus Universitario de Cartuja, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958 243857; fax: +34 958 243862.
E-mail address: joaquina@ugr.es (J. Martín-Sánchez).



2. Material and methods

2.1. Study areas

The geographical locations from which *P. sergenti* was sampled are shown in Fig. 1. Latitude and longitude, of the different sampled localities, are indicated.

2.2. Collection and morphological identification of specimens

Sandflies were captured overnight with miniature CDC light traps and preserved in liquid nitrogen or at -20°C until morphological and molecular identification (Table 1). They were slide-mounted in Berlese fluid following dissection and morphologically identified based on external and internal characters of the head and genitalia according to the keys of Gil Collado et al. (1989) and Gállego et al. (1992).

2.3. Sandfly DNA extraction

Genomic DNA was extracted from the thorax and the attached anterior abdomen of individual sandflies (Martín-Sánchez et al., 2000). Briefly, each sandfly was placed in a 1.5-ml Eppendorf tube and kept in liquid nitrogen for a few seconds to facilitate the rupture of cell membranes. The tissue was crushed by a pestle in lysis buffer (10 μl of SCE (sorbitol 1 M, sodium citrate 0.1 M, EDTA 0.06 M), 30 μl of SDS-EDTA (SDS 1%, EDTA 0.15 M) and 10 μl of proteinase K 1%) and then incubated at 42°C overnight. Subsequently, the DNA was purified with one phenol–chloroform–isoamyl alcohol extraction, followed by one chloroform–isoamyl alcohol extrac-

tion and then an ethanol precipitation. The precipitated pellet was resuspended in 50 μl of bidistilled water and kept at -20°C until use.

2.4. PCR amplification

The polymerase chain reaction was used to amplify a fragment of 418–433 bp containing the ITS2 of sandfly rDNA following the methodology described by Depaquit et al. (2002).

PCR was also used to amplify a 550-bp fragment containing the 3' end of the mitochondrial gene *Cyt b* following the methodology described by Essegir et al. (1997). In the specimens in which this PCR did not work, an internal fragment of 442 bp was amplified following the methodology described by Yahia et al. (2004).

2.5. Sequencing and comparative sequence analysis

PCR products were directly sequenced in both directions using the primers used for DNA amplification. Sequences were edited and aligned to identify haplotypes (=unique sequences) using Clustal-X 1.81 software and manually adjusted, if necessary. Poly(AT) was excluded from ITS sequences. Phylogenetic analysis was performed using PHYLIP version 3.65 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>). *Phlebotomus longicuspis* was used as an outgroup.

3. Results

Comparative ITS2 sequence analysis of *P. sergenti* (Table 2): we have analysed this rDNA sequence in 25 *P. sergenti* individuals



Fig. 1. Geographical locations of the *P. sergenti* sampled populations with indication of the co-ordinates: (1) Sant Jaume de Llierca, Girona province ($42^{\circ}12'N$, $2^{\circ}37'E$), (2) Sant Just Desvern, Barcelona province ($41^{\circ}22'N$, $2^{\circ}04'E$), (3) Puerto de la Cadena, Murcia province ($37^{\circ}09'N$, $1^{\circ}13'W$), (4) Torvizcón, Granada province ($36^{\circ}53'N$, $3^{\circ}18'W$), (5) Almáchar, Málaga province ($36^{\circ}48'N$, $4^{\circ}13'W$), (6) Benaolán, Málaga province ($36^{\circ}43'N$, $5^{\circ}15'W$), (7) Las Caballerizas, Málaga province ($37^{\circ}02'N$, $4^{\circ}43'W$), (8) Riotinto, Huelva province ($37^{\circ}41'N$, $6^{\circ}33'W$), (9) Chechouene, Chaouen province ($34^{\circ}53'N$, $3^{\circ}49'W$), (10) Taounate, Taounate province ($34^{\circ}32'N$, $7^{\circ}59'W$) and (11) Dar Bachir, Marrakech province ($31^{\circ}31'N$, $7^{\circ}28'W$).



Table 1
List of the individuals used in this study

Specimen code	Sex: M or F	Origin (country, locality and number assigned in Fig. 1) and year of catching	Studied markers	Gen Bank accession number	
				Cyt b	ITS
P-6	M	Spain, Benaojan, 6, 2003	Cyt b	EU980375	
P-7	M	Spain, Benaojan, 6, 2003	Cyt b	EU980375	
P-17	M	Spain, Las Caballerizas, 7, 2003	ITS and Cyt b	EU980375	EU980385
P-46	M	Spain, Las Caballerizas, 7, 2003	ITS and Cyt b	EU980375	EU980386
P-47	M	Spain, Las Caballerizas, 7, 2003	Cyt b	EU980375	-
P-48	M	Spain, Las Caballerizas, 7, 2003	Cyt b	EU980375	-
P-49	F	Spain, Las Caballerizas, 7, 2003	Cyt b	EU980378	-
P-50	F	Spain, Las Caballerizas, 7, 2003	ITS and Cyt b	EU980376	EU980385
P-52	F	Spain, Las Caballerizas, 7, 2003	ITS and Cyt b	EU980378	EU980385
AM-1	M	Spain, Almachar, 5, 1999	Cyt b	EU980375	-
AM-2	F	Spain, Almachar, 5, 1999	ITS and Cyt b	EU980375	EU980385
AM-3	F	Spain, Almachar, 5, 1999	ITS and Cyt b	EU980380	EU980385
AM-4	M	Spain, Almachar, 5, 1999	Cyt b	EU980381	-
AM-5	M	Spain, Almachar, 5, 1999	Cyt b	EU980380	-
AM-6	F	Spain, Almachar, 5, 1999	ITS	-	EU980385
TM-1	M	Spain, Torvizcón, 4, 1999	ITS and Cyt b	EU980380	EU980385
TM-2	F	Spain, Torvizcón, 4, 1999	Cyt b	EU980380	-
TM-3	F	Spain, Torvizcón, 4, 1999	ITS and Cyt b	EU980380	EU980385
TM-4	M	Spain, Torvizcón, 4, 1999	Cyt b	EU980380	-
TM-5	F	Spain, Torvizcón, 4, 1999	Cyt b	EU980375	-
TM-6	M	Spain, Torvizcón, 4, 1999	Cyt b	EU980375	-
TM-7	F	Spain, Torvizcón, 4, 1999	Cyt b	EU980380	-
TM-8	M	Spain, Torvizcón, 4, 1999	ITS and Cyt b	EU980375	EU980385
TM-9	M	Spain, Torvizcón, 4, 1999	Cyt b	EU980375	-
P-121	M	Spain, Torvizcón, 4, 2002	Cyt b	EU980380	-
P-124	M	Spain, Torvizcón, 4, 2002	Cyt b	EU980380	-
P-127	M	Spain, Torvizcón, 4, 2002	Cyt b	EU980380	-
P-128	M	Spain, Torvizcón, 4, 2002	Cyt b	EU980380	-
P-131	F	Spain, Torvizcón, 4, 2002	Cyt b	EU980380	-
R-9	M	Spain, P. de la Cadena, Murcia, 3, 1999	ITS	-	EU980387
P-137	F	Spain, Sant Just Desvern, 2, 2002	ITS and Cyt b	EU980375	EU980385
P-139	M	Spain, Sant Just Desvern, 2, 2002	ITS	-	EU980385
P-141	M	Spain, Sant Just Desvern, 2, 2002	Cyt b	EU980380	-
P-143	F	Spain, Sant Just Desvern, 2, 2002	ITS and Cyt b	EU980379	EU980385
P-146	M	Spain, Sant Just Desvern, 2, 2002	Cyt b	EU980380	-
P-149	M	Spain, Sant Just Desvern, 2, 2002	ITS	-	EU980385
P-156	M	Spain, Sant Just Desvern, 2, 2002	Cyt b	EU980380	-
P-184	F	Spain, Sant Jaume de Llierca, 1, 2002	ITS and Cyt b	EU980375	EU980385
RT-1	M	Spain, Riotinto, 8, 2000	Cyt b	EU980377	-
RT-2	F	Spain, Riotinto, 8, 2000	ITS and Cyt b	EU980375	EU980385
CH-14	M	Morocco, Chechaouene, 9, 1995	Cyt b	EU980380	-
MA-1	F	Morocco, Taounate, 10, 1995	ITS and Cyt b	EU980364	EU980383
MA-2	M	Morocco, Taounate, 10, 1995	ITS and Cyt b	EU980366	EU980383
MA-3	M	Morocco, Taounate, 10, 1995	Cyt b	EU980365	-
MA-4	M	Morocco, Taounate, 10, 1995	Cyt b	EU980365	-
MA-5	F	Morocco, Taounate, 10, 1995	Cyt b	EU980367	-
MA-7	M	Morocco, Taounate, 10, 2005	Cyt b	EU980368	-
MA-8	M	Morocco, Taounate, 10, 1995	Cyt b	EU980364	-
MA-9	F	Morocco, Taounate, 10, 2005	ITS and Cyt b	EU980368	EU980383
MA-10	M	Morocco, Taounate, 10, 1995	Cyt b	EU980364	-
MA-11	M	Morocco, Taounate, 10, 1995	Cyt b	EU980368	-
MA-14	M	Morocco, Dar Bachir, 11, 2005	ITS and Cyt b	EU980370	EU980382
MA-16	M	Morocco, Dar Bachir, 11, 2005	ITS and Cyt b	EU980370	EU980382
MA-17	F	Morocco, Dar Bachir, 11, 2005	ITS and Cyt b	EU980369	EU980382
MA-18	M	Morocco, Dar Bachir, 11, 2005	ITS and Cyt b	EU980373	EU980382
MA-19	F	Morocco, Dar Bachir, 11, 2005	Cyt b	EU980370	-
MA-20	M	Morocco, Dar Bachir, 11, 2005	ITS and Cyt b	EU980371	EU980384
MA-21	M	Morocco, Dar Bachir, 11, 2005	Cyt b	EU980372	-

collected in 7 Spanish localities (17 specimens) and 2 Moroccan ones (8 specimens). Five different haplotypes have been identified: 2 in the Spanish populations exclusively (S-B ITS and S-C ITS), another 2 in the Moroccan ones (M-A ITS and M-C ITS) and one (S-A/M-B ITS) shared by both of them. These haplotypes differ in only 1–3 nucleotides. S-A/M-B ITS is the ribosomal haplotype most frequently and widely represented among the Spanish populations of *P. sergenti* being found in all the localities sampled except in Murcia (locality 6). It is also the only haplotype that

we found in the Rif (north of Morocco) although it is absent in the south. Sequences were identical for specimens sampled from the same location except in Las Caballerizas (locality 7, south of Spain) with two haplotypes and in Dar Bachir (locality 11, south of Morocco) with another two, one of them was heterozygote, in three sites.

Parsimony analysis identified a single tree of 159 steps. The topology was similar to that shown by the tree based on distance analysis (F84 model with a UPGMA method of clustering). None of

**Table 2**

Alignment of nucleotide characters at the polymorphic sites in the rDNA ITS 2 haplotypes of *P. sergenti*. (Also it is indicated the number of specimens of each haplotype from the different sampled localities named as in Fig. 1. Y = heterozygote T and C)

ITS2 HAPLOTYPES						Number of specimens with each haplotype in different localities										
	1	1	2	2	3	Spain								Morocco		
	4	7	0	5	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S-A/M-B	G	C	A	T	T	1	4		3	3		3	1		3	
S-B	A	C	A	T	T							1				
S-C	G	C	C	T	T			1								
M-A	G	T	A	T	T										4	
M-C	G	Y	A	Y	Y										1	

Y = heterozygote T and C

these branches were supported by the bootstrap analysis (results not shown).

These new sequences (Table 1) have been aligned with the published ones in PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Fig. 2 shows the maximum parsimony tree generated when including the previously published sequences (Depaquit et al., 2002) of which also the poly(AT) was eliminated from the analysis. The topology of the UPGMA genetic distance tree was similar. The 5 haplotypes of *P. sergenti* identified in this study in the Spanish and Moroccan populations appear closely related among themselves, clustering with the population of Morocco previously sequenced and differing from the Spanish population previously sequenced which appears as a sister group with strong bootstrap support (94.8%).

Comparative Cyt *b* sequence analysis of *P. sergenti* (Tables 3 and 4): We have analysed this mtDNA sequence in 54 *P. sergenti* individuals from 7 Spanish populations (36 specimens) and 3 Moroccan ones (18 specimens). Sixteen haplotypes have been identified: 6 in Spain exclusively, 9 in Morocco and one shared by both countries. The mitochondrial haplotypes predominant in Spain are S-A Cyt *b* and M-A/S-F Cyt *b* which represent 36.1 and 44.4%, respectively, of the whole of the sequenced samples.

S-A Cyt *b* is the haplotype with a wider geographical range, being present in all the studied Spanish populations. M-A/S-F Cyt *b* has a more limited geographical range in Spain, being found in two southern localities (Almáchar and Torvizcón) and in one from the northeast (Sant Just Desvern); belonging to the mitochondrial lineage III which is widely represented in northern Morocco (Table 3). The sequenced specimens from Torvizcón came from captures carried out in two different dates, 1999 and 2002 (Table 1). In 1999, M-A/S-F Cyt *b* was found in 5 of the 9 specimens studied whilst in 2002 it was found in all the 5 specimens analysed. The haplotype S-G Cyt *b* is closely related with the aforementioned one which only differs in one base being a transversion (A for G in position 160). We found it exclusively in Almáchar together with M-A/S-F Cyt *b* and S-A Cyt *b*.

Both distance and parsimony trees (Fig. 3a and b, respectively) situate these mitochondrial haplotypes in four branches separated by a great absolute nucleotide distance (6–15 fixed polymorphisms) and generally well supported in the bootstrap analysis. Table 3 indicates the number of specimens of each haplotype in the different geographical locations. Table 4 relates the whole of the polymorphic positions which identify the 16 haplotypes as well as the synapomorphic diagnostic characters for the lineages; for the latter

Table 3

Relation of haplotypes of each one of the identified mitochondrial lineages (Cyt *b*). (Also it is indicated the number of specimens of each haplotype from the different sampled localities named as in Fig. 1)

Lineage and mt haplotype	Number of specimens with each Cyt <i>b</i> haplotype in different localities										
	Spain								Morocco		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Lineage I											
S-A	1	1		4	2	2	4	1			
S-B							2				
S-C							1				
S-D		1									
S-E								1			
Lineage II											
M-G											3
M-H											1
M-I											1
Lineage III											
S-F/M-A		3		10	2				1	3	
S-G					1						
M-B										2	
M-C										1	
M-D										1	
M-E										3	
M-F											1
Lineage IV											
M-J											1

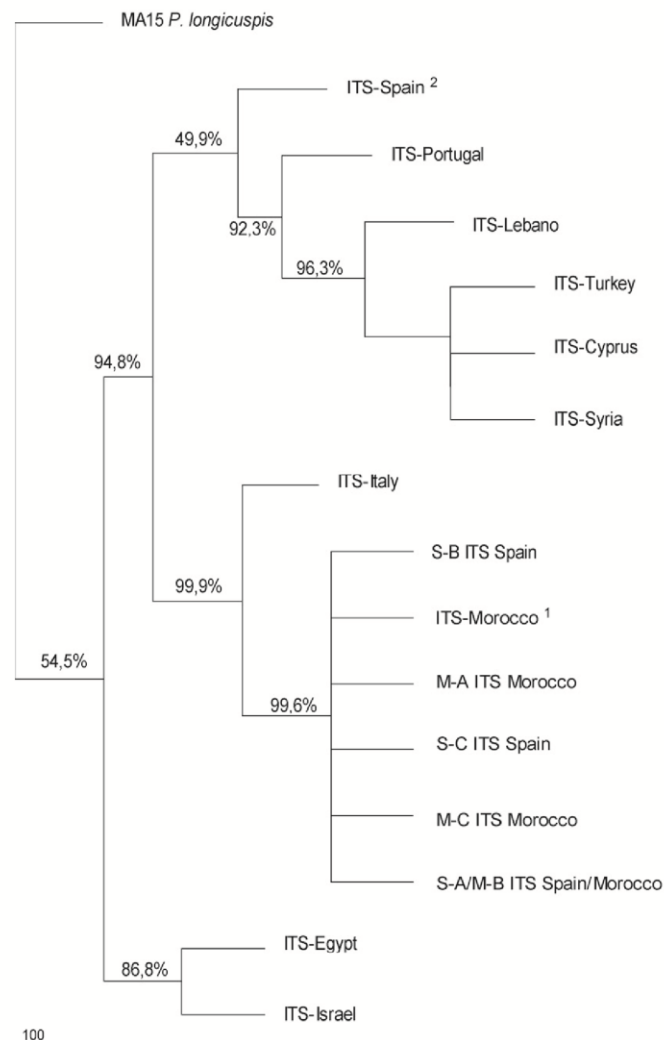


Fig. 2. rDNA ITS2 phylogenetic tree including the sequences obtained by Depaquit et al. (2002). The tree is generated by maximum parsimony method. *Phlebotomus longicuspis* is used as outgroup. The numbers above the branches are bootstrap percentages (1000 replications) for clades supported above the 50%. ¹Its sequence is coincident with the S-A/M-B ITS sequence. ²This sequence shows differences in 13–16 nucleotides to the Spanish ones sequenced by us. The ecological niche of this population was destroyed as a consequence of human activities shortly after its capture in 1994. Hence we have not been able to incorporate this population into our study.

we have kept in mind the previously published sequences (Yahia et al., 2004).

Combined analysis of ITS2 and Cyt *b* sequences: We have analysed both sequences in 12 *P. sergenti* individuals collected in 6 Spanish localities and 8 specimens collected in 2 Moroccan ones. Table 5 shows the haplotypes of both markers which are found associated in each one of these individuals.

4. Discussion

The obtained results show a high diversity between specimens of *P. sergenti* in Spain where we find 3 ribosomal and 7 mitochon-

drial haplotypes. Some of the genetic variants are also present in Morocco where the polymorphism of *P. sergenti* is larger (3 ribosomal and 10 mitochondrial haplotypes). The 5 ITS haplotypes identified in this study are closely related to each other and belong to the same ribosomal lineage (Fig. 2). The information given by this marker is much smaller than the one observed in the mitochondrial sequences that seem to be more appropriate for the study of the intraspecific variability of *P. sergenti* in a more limited geographical environment. Thus, the 16 Cyt *b* haplotypes are distributed in 4 mitochondrial lineages (which we have named I, II, III, and IV lineages) well differentiated and well supported in the bootstrap analysis (Fig. 3a). The mitochondrial lineage I corresponds

**Table 4**

Alignment of nucleotide characters at the polymorphic sites in the mt DNA Cytochrome *b* haplotypes of *P. sergenti* with indication of the synapomorphic (highlighted) and the variable characters (underlined) for each lineage

LINEAGE	Cyt b Haplotypes																																								
		1	3	6	8	3	0	2	3	4	4	5	6	6	6	7	8	9	9	0	0	2	4	4	4	5	6	6	7	7	8	8	9	1	2	2	2	3	3		
IV	M-J	A	T	T	T	C	A	C	C	T	T	C	A	G	T	T	C	A	T	C	A	T	T	G	C	A	G	T	C	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	G	A
II	M-G	A	C	C	T	C	A	C	T	T	C	C	G	G	T	T	T	A	T	C	A	C	C	A	C	A	G	C	T	A	C	C	C	T	C	T	C	T	G	A	
	M-H	A	C	C	T	C	A	I	T	T	C	C	G	G	T	T	T	A	T	C	A	C	C	A	C	A	G	C	T	A	C	C	C	T	C	T	C	T	G	A	
	M-I	A	C	C	T	C	A	C	T	T	C	C	G	G	T	T	T	A	T	C	A	C	C	A	I	A	G	C	T	A	C	C	C	T	C	T	C	T	G	A	
III	M-A/S-F	A	C	C	T	C	T	C	T	T	T	A	A	C	C	T	G	T	C	A	C	C	A	C	A	G	T	T	C	C	T	C	T	C	A	T	T	A	A		
	M-B	A	C	C	T	C	T	C	T	T	T	A	A	C	C	T	G	T	I	A	C	C	A	C	A	G	T	T	C	C	T	C	T	C	A	T	T	A	A		
	M-C	A	C	C	T	I	T	C	C	T	C	A	A	C	C	T	G	T	I	A	C	C	A	C	A	G	T	T	C	C	T	C	T	C	A	T	T	A	A		
	M-D	A	C	C	C	C	T	C	C	T	T	T	A	A	C	C	T	G	T	C	A	C	C	A	C	A	G	T	T	C	C	T	C	T	C	A	T	T	A	A	
	M-E	A	C	C	T	C	T	C	C	T	T	T	A	A	C	C	T	G	T	C	A	C	C	A	C	I	G	T	T	C	C	T	C	T	C	A	T	T	A	A	
	M-F	A	C	I	T	C	C	C	T	T	T	A	A	C	C	T	A	T	C	G	C	C	A	C	A	A	T	T	C	C	T	C	T	C	A	T	T	A	A		
	S-G	A	C	C	T	C	T	C	C	T	T	A	A	C	C	T	G	T	C	A	C	C	A	C	A	A	A	T	T	C	C	T	C	T	C	A	T	T	A	A	
I	S-A	G	C	C	T	C	A	C	C	C	T	C	G	G	T	T	T	G	G	C	A	C	C	G	C	A	G	C	T	C	C	T	C	T	C	C	T	A	T		
	S-B	G	C	C	T	C	A	C	C	C	T	C	G	G	T	T	T	G	G	C	A	C	C	G	C	A	G	C	T	C	C	T	C	T	I	C	C	T	A	T	
	S-C	A	C	C	T	C	A	C	C	C	T	C	G	G	T	T	T	G	G	C	A	C	C	G	C	A	G	C	T	C	C	T	C	T	C	C	C	T	A	T	
	S-D	G	C	C	T	C	A	C	C	C	T	C	G	G	T	T	T	G	G	C	A	C	C	G	C	A	G	C	T	C	C	T	C	T	C	C	C	C	A	T	
	S-E	G	C	C	T	C	A	C	C	C	T	C	G	G	T	T	T	G	G	C	A	C	C	G	C	A	G	C	T	C	C	T	C	T	C	C	T	A	T		

to the Spanish lineage of *P. sergenti* with S-A Cyt *b* being the most representative haplotype which shows a wider geographical distribution. The mitochondrial lineage III is represented in Spain mainly by the haplotype M-A/S-F Cyt *b* and in a lesser degree by S-G Cyt *b*, closely related with the former and from which it may have derived by mutation. This lineage is widely represented in the north of Morocco where it shows a larger genetic diversity: 6 haplotypes differing from 1 to 5 nucleotides. The mitochondrial lineages II and IV, integrated by 3 and 1 haplotypes, respectively, are present only in the south of Morocco.

The larger genetic diversity of *P. sergenti* in Morocco is consistent with the hypothesis of dispersion of *P. sergenti* expressed by

Depaquit et al. (2000, 2002). According to these authors, *P. sergenti* would have colonised Spain from Morocco, before the opening of the Strait of Gibraltar, approximately 5 million years ago. The clustering in the rDNA ITS2 phylogenetic tree (Fig. 2) of the populations from Spain, Morocco and Italy is in agreement with the migratory route proposed for this Phlebotomine sandfly by these authors. Presumably, the Spanish variants would have originated later on by mutation from these early settlers.

M-A/S-F Cyt *b* represents 44.4% of the whole of the Spanish sequenced samples, against the 36.1% represented by S-A Cyt *b*, the representative haplotype of the Spanish mitochondrial lineage. However, M-A/S-F Cyt *b* has a more limited geographi-

Table 5

Relation of individuals in which it has been possible to sequence both markers with indication of the haplotypes ITS and Cyt *b* found associated

Specimen code	ITS	Cyt <i>b</i>		Geographical location (number in Fig. 1)
	ITS haplotype	Cyt <i>b</i> haplotype	mt lineage	
P-17	S-A/M-B	S-A	I	Las Caballerizas (7)
P-46	S-B	S-A	I	Las Caballerizas
P-50	S-A/M-B	S-C	I	Las Caballerizas
P-52	S-A/M-B	S-B	I	Las Caballerizas
AM-2	S-A/M-B	S-A	I	Almáchar (5)
AM-3	S-A/M-B	M-A/S-F	III	Almáchar
TM-1	S-A/M-B	M-A/S-F	III	Torvizcón (4)
TM-3	S-A/M-B	M-A/S-F	III	Torvizcón
TM-8	S-A/M-B	S-A	I	Torvizcón
P-137	S-A/M-B	S-A	I	Sant Just Desvern (2)
P-143	S-A/M-B	S-D	I	Sant Just Desvern
P-184	S-A/M-B	S-A	I	Sant Jaume de Llierca (1)
RT-2	S-A/M-B	S-A	I	Riotinto (8)
MA-1	S-A/M-B	M-A/S-F	III	Taounate (10)
MA-2	S-A/M-B	M-C	III	Taounate
MA-9	S-A/M-B	M-E	III	Taounate
MA-14	M-A	M-G	II	Dar Bachir (11)
MA-16	M-A	M-G	II	Dar Bachir
MA-17	M-A	M-F	III	Dar Bachir
MA-18	M-A	M-J	IV	Dar Bachir
MA-20	M-C	M-H	II	Dar Bachir



cal range in Spain, being found only in two southern locations (Almáchar and Torvizcón) and in one from the northeast (Sant Just Desvern).

All the Spanish populations studied in the present work in which both markers have been studied shared some haplotypes (ITS or Cyt *b* or both) with the specimens coming from Moroccan populations and two of the Spanish populations (Almáchar and Torvizcón) situated in the south of the country shared the same combination of ITS–Cyt *b* as the Moroccan from Taounate (Table 5). Conversely, the Moroccan population from Dar Bachir does not share any of the haplotypes present in Spain nor from the other Moroccan localities analysed by us. This location is situated in the south of Morocco far from the other two.

In Morocco, cutaneous leishmaniasis due to *L. tropica* is endemic in the south and emergent with epidemical character in several

points of the north and the centre (Guessous-Idrissi et al., 1997). Yahia et al. (2004) identify in Morocco 3 mt DNA lineages of *P. sergenti*. These lineages, and some of the haplotypes, are similar to the ones identified by us in Morocco. Our lineage III coincides with the so-called “Taza lineage” of Yahia et al. (2004) that is found in all the three Moroccan foci of CL researched by the authors. Lineage I is an exclusively Spanish lineage and for this reason it does not have any similarities with the ones found by Yahia et al. (2004).

The presence in Spain of a mitochondrial lineage of *P. sergenti* typically Spanish together with another one common in Morocco where the ACL is endemic and/or emergent could have important epidemiological consequences. It will be necessary to find out if there are or are not differences in the vectorial capacity between these two lineages of *P. sergenti*.

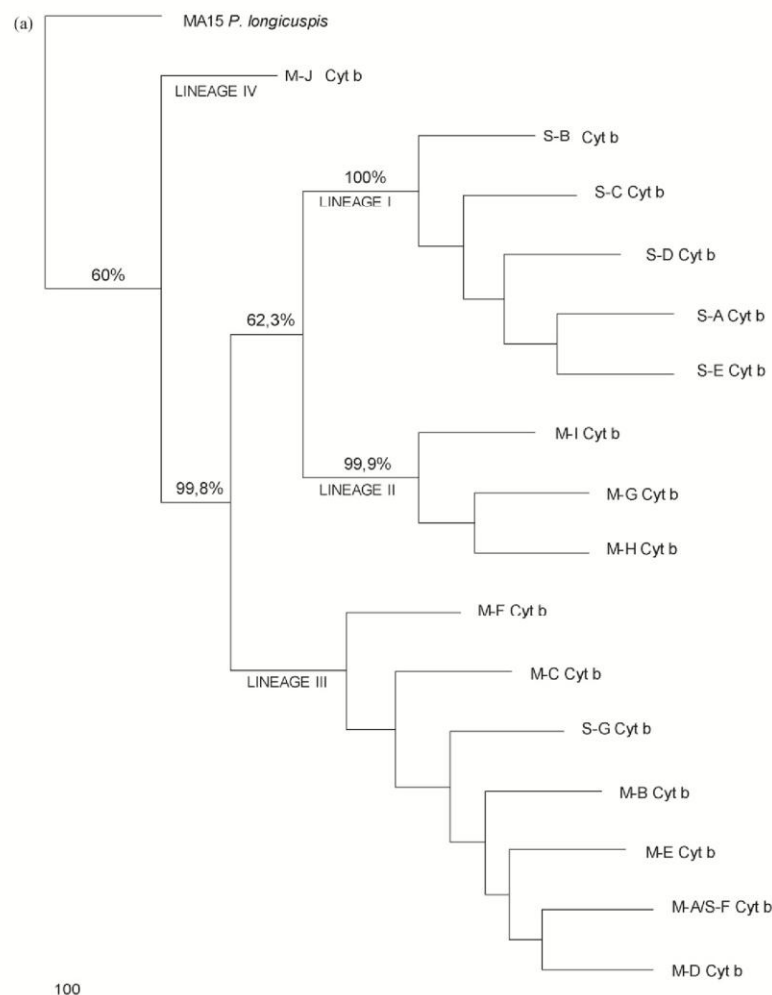


Fig. 3. Phylogenetic trees based on mtDNA Cyt *b* sequence data and obtained by distance analysis—F84 model with a UPGMA method of clustering (a) and maximum parsimony method (b). *Phlebotomus longicuspis* is used as an outgroup. The numbers above the branches are bootstrap percentages (1000 replications) for clades supported above the 50%.

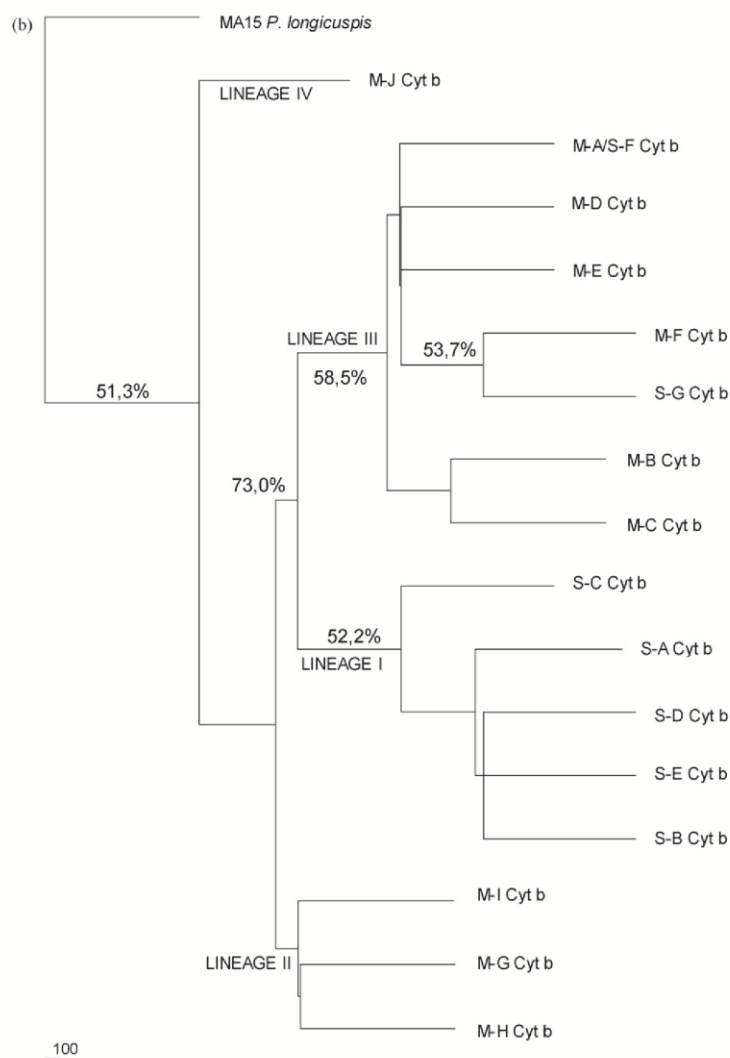


Fig. 3. (Continued).

Acknowledgements

To the FIS (no. 99/0036 and 01/0831), MEC (no. GL2004-06-909-C02-02), the Junta de Andalucía (group CVI176) and UE (EDEN, Contract no. 010294-2) for financial assistance. We also wish to thank B. Pesson and E. Martínez-Ortega for providing us some of the Phlebotomine sandflies.

References

- Al-Zahrani, M.A., Peters, W., Evans, P.A., Ching-Chin, I., Smith, V., Lane, R.P., 1988. *Phlebotomus sergenti*, a vector of *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 416.
- Depaquit, J., Ferte, H., Léger, N., Killick-Kendric, R., Rioux, J.A., Killick-Kendrick, M., Hanafi, H.A., Gubert, S., 2000. Molecular systematics of the *Phlebotomine* sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. Insect. Mol. Biol. 30, 387–393.
- Depaquit, J., Ferte, H., Léger, N., Lefrac, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Márquez, F., Rioux, J.A., Svobodova, M., Volf, P., 2002. ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. Int. J. Parasitol. 32, 1123–1131.
- Di Muccio, T., Marinucci, M., Frusteri, L., Maroli, M., Pesson, B., Gramiccia, M., 2000. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larrousius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. Insect. Biochem. Mol. Biol. 30, 387–393.
- Esseghir, S., Ready, P.D., Killick-Kendrick, R., Ben-Ismaïl, R., 1997. Mitochondrial haplotypes and geographical vicariance of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. Insect. Mol. Biol. 6, 211–225.
- Gállego, J., Botet, J., Gállego, M., Portús, M., 1992. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. In: S. Hernández (Ed.), In Memoriam al Prof. Dr. D.F. de P. Martínez Gómez, Publicaciones de la Universidad de Córdoba, 581–590.



- Gállego, M., Pratlong, F., Riera, C., Muñoz, C., Ribera, E., Fisa, R., Rioux, J.A., Dedet, J.P., Portús, M., 2002. Isoenzymatic identification of *Leishmania* isolates from repeated clinical human leishmaniasis episodes in Catalonia (Spain). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 45–47.
- Gil Collado, J., Morillas Márquez, F., Sanchís Marín, M.C., 1989. Los flebotomos en España. *Rev. San. Hig. Pub.* 63, 15–34.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., Pesson, B., Pichon, G., 2005. Entomological investigations in Chichaoua: an emerging epidemic focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *J. Med. Entomol.* 42, 697–701.
- Guessous-Idrissi, N., Chiheb, S., Hamdani, A., Riyad, M., Bichichi, M., Hamdani, S., Krimech, A., 1997. Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *Leishmania tropica* in north Morocco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 660–663.
- Guilvard, E., Rioux, J.A., Gállego, M., Pratlong, F., Mahjour, J., Martínez-Ortega, E., Dereure, J., Saddiki, A., Martín, A., 1991. *Leishmania tropica* au Maroc. III. Rôle vecteur de *Phlebotomus sergenti*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66, 96–99.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F., 2004. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 228–232.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Pesson, B., Morillas-Márquez, F., 2000. Genetic polymorphism in sympatric species of the genus *Phlebotomus*, with special reference to *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera, Phlebotomidae). *Parasite* 7, 247–254.
- Martínez Ortega, E., Conesa Gallego, E., 1987. Fenología de *Phlebotomus papatasi* y *Phlebotomus sergenti* (Diptera Psychodidae) en el sureste de la Península Ibérica. *Bol. Asoc. Esp. Entom.* 11, 313–319.
- Moin-Vaziri, V., Depaquit, J., Yaghoobi-Ershadi, M.-R., Oshaghi, M.-A., Derakhshandeh-Peykar, P., Ferté, H., Kaltenbach, M., Barges, M.D., Léger, N., Nadim, A., 2007. Intraspecific variation within *Phlebotomus sergenti* Parrot (1917) (Diptera: Psychodidae) based on mtDNA sequences in Islamic Republic of Iran. *Acta Trop.* 102, 29–37.
- Perrotey, S., Mahamdallie, S.S., Pesson, B., Richardson, K.J., Gállego, M., Ready, P.D., 2005. Postglacial dispersal of *Phlebotomus perniciosus* into France. *Parasite* 12, 283–291.
- Pesson, B., Ready, J.S., Benabdennbi, I., Martín-Sánchez, J., Essegir, S., Cadi-Soussi, M., Morillas-Márquez, F., Ready, P.D., 2004. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med. Vet. Entomol.* 18, 25–37.
- Rhajaoui, M., Fellah, H., Pratlong, F., Dedet, J.P., Lyagoubi, M., 2004. Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 299–301.
- Sanchís-Marín, M.C., Morillas-Márquez, F., González-Castro, J., Benavides-Delgado, I., Reyes-Magaña, A., 1986. Dinámica estacional de los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae) de la provincia de Almería (España). *Rev. Iber. Parasitol.* 46, 285–291.
- Yahia, H., Ready, P.D., Hamdani, A., Testa, J.M., Guessous-Idrissi, N., 2004. Regional genetic differentiation of *Phlebotomus sergenti* in three Moroccan foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Parasite* 11, 189–199.





3.2. Artículo 2: Genetic structure of *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: Epidemiological implications.

Estructura genética de las poblaciones de *Phlebotomus (Larroussius) ariasi*, vector de *Leishmania infantum* en el oeste mediterráneo: Implicaciones epidemiológicas.

Franco F.A.L., Morillas-Márquez F., **Barón S.D.**, Morales-Yuste M., Gálvez R., Díaz V., Pesson B., Alves-Pires C., Depaquit J., Molina R., Odette Afonso M., Gállego M., Guernaoui S., Bounamous A., Martín-Sánchez J.

International Journal for Parasitology (2010); 40(11): 1335-46.

Factor de Impacto: Año de publicación - 3'822 1^{er} cuartil (4/32 en Parasitology).

Actual - 3'637 1^{er} cuartil (6/35 en Parasitology).

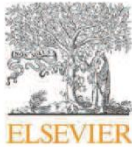
Resumen: En los últimos años ha habido un creciente interés en el análisis de las variaciones geográficas entre poblaciones de diferentes especies del género *Phlebotomus* mediante la comparación de las secuencias de varios genes. Sin embargo, se sabe poco sobre la estructura genética de *Phlebotomus ariasi*. En este estudio, hemos sido capaces de secuenciar un fragmento del gen mitocondrial Cyt b en 133 flebotomos identificados morfológicamente como *P. ariasi* y procedentes de una amplia área geográfica que abarca 35 localidades en 11 regiones diferentes de cinco países. La diversidad intraespecífica de *P. ariasi* es alta, con 45 haplotipos diferentes entre sí por 1-26 bases, y se distribuye en dos líneas mitocondriales, una limitada geográficamente a Argelia y la otra ampliamente dispersa en los países mediterráneos. La línea de Argelia se caracteriza por tener 13 polimorfismos fijos y se



compone de un único haplotipo. La línea Europea/Marroquí de *P. ariasi* se caracteriza por estar compuesta por una gran diversidad de haplotipos (44) que muestran alguna estructuración geográfica. Este podría ser uno de los múltiples factores implicados en la heterogeneidad epidemiológica de los focos de leishmaniasis. *Phlebotomus chadlii* es el grupo hermano de los *P. ariasi* Europeos/Marroquí. La separación del haplotipo argelino, H45, del resto de los especímenes, *P. ariasi* Europeos/Marroquí y *P. chadlii*, está bien soportado por el análisis de bootstrap.



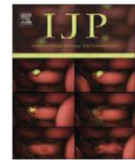
International Journal for Parasitology 40 (2010) 1335–1346



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara



Genetic structure of *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: Epidemiological implications [☆]

Fernando A.L. Franco ^a, Francisco Morillas-Márquez ^a, Sergio D. Barón ^a, Manuel Morales-Yuste ^a, Rosa Gálvez ^b, Victoriano Díaz ^a, Bernard Pesson ^c, Carlos Alves-Pires ^d, Jerome Depaquit ^e, Ricardo Molina ^b, M. Odette Afonso ^d, Montserrat Gállego ^f, Souad Guernaoui ^g, Azzedine Bounamous ^e, Joaquina Martín-Sánchez ^{a,*}

^a Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Spain

^b Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, France

^d Unidade de Entomologia Médica, Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

^e Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

^f Laboratorio de Parasitología, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Spain

^g Caractérisation et contrôle des populations de vecteurs Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2009

Received in revised form 26 March 2010

Accepted 31 March 2010

Keywords:

Phlebotomus (Larroussius) ariasi

Genetic structure

Populations

Mitochondrial gene Cyt *b*

Haplotypes

Lineages

Leishmania infantum

Phlebotomus chadlii

ABSTRACT

In recent years there has been growing interest in analyzing the geographical variations between populations of different *Phlebotomus* spp. by comparing the sequences of various genes. However, little is known about the genetic structure of *Phlebotomus ariasi*. In this study, we were able to sequence a fragment of the mitochondrial Cyt *b* gene in 133 sandflies morphologically identified as *P. ariasi* and proceeding from a wide geographical range covering 35 locations in 11 different regions from five countries. The intra-specific diversity of *P. ariasi* is high, with 45 haplotypes differing from each other by one to 26 bases and they are distributed in two mitochondrial lineages, one limited geographically to Algeria and the other widely dispersed across Mediterranean countries. The Algerian lineage is characterized by having 13 fixed polymorphisms and is made up of one sole haplotype. The European/Moroccan *P. ariasi* lineage is characterized by being made up of a great diversity of haplotypes (44) which display some geographical structuring. This could be one of the multiple factors involved in the epidemiological heterogeneity of the foci of leishmaniasis. *Phlebotomus chadlii* is the sister group of European/Moroccan *P. ariasi*. The separation of the Algerian haplotype, H45, from the rest of the specimens, European/Moroccan *P. ariasi* and *P. chadlii*, is well supported by the bootstrap analysis.

© 2010 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis represents a group of extremely diverse diseases – both in clinical and epidemiological terms – which are considered by the World Health Organization (WHO) to constitute a serious public health risk (Desjeux, 2004). Approximately 70 sandfly (*Phlebotomus*) spp. transmit more than 20 spp. of *Leishmania* and other pathogens such as *Phlebovirus* in areas which vary from wet tropical forest to desert, with altitudes ranging from sea level up to high mountains. Not all sandfly species can transmit any *Leishmania* spp., there being some cases in which a zoological specificity exists between the *Leishmania* spp. and the sandfly subgenus (Léger and Depaquit,

1999). Volf and Myskova (2007) proposed a classification of ‘permissive’ and ‘specific’ vectors, according to whether or not they support the development of multiple *Leishmania* spp., a factor which would be related to the attachment of the parasite to the sandfly midgut through lipophosphoglycan (LPG) receptors or other lectin-like mechanisms which are independent of LPG.

In countries of the western Mediterranean Basin, *Leishmania infantum* is the only species responsible for visceral leishmaniasis and is a significant cause of cutaneous leishmaniasis. The vectors of *L. infantum* mainly belong to the subgenus *Larroussius* (*La*). *Phlebotomus (La) perniciosus*, *Phlebotomus (La) ariasi*, *Phlebotomus (La) perfiliewi*, *Phlebotomus (La) neglectus*, *Phlebotomus (La) tobbi* and *Phlebotomus (La) langeroni* are proven vectors of *L. infantum*, whilst it is suspected that *Phlebotomus (La) longicuspis* also plays a role (Maroli et al., 1987, 1994; Léger et al., 1988, 2000; Doha and Saeta, 1992; Martín-Sánchez et al., 1994, 1996; Guilvard et al., 1996). The sympatric coexistence of several of these species is common in the

[☆] Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ database under the Accession Nos. x–x.

* Corresponding author. Tel.: +34 958 242094; fax: +34 958 243862.

E-mail address: joaquina@ugr.es (J. Martín-Sánchez).



various different foci of infection, with the bioclimatic characteristics of the area and altitude greatly influencing their density and abundance, and therefore also their relative significance as vectors of *L. infantum* (Rioux et al., 1980; Morillas-Márquez et al., 1983; Lucientes-Curdi et al., 1991; Afonso et al., 2001; Aransay et al., 2004; Guernaoui et al., 2005).

Studies on the flight range of adult *P. ariasi* indicate that this is limited to a maximum radius of 2.2 km, with no evidence having been found to suggest that they make use of wind currents to assist them in their travels. Furthermore, the maximum flight speed of *P. ariasi* has been estimated in the range of 2.3–2.5 km/h, somewhat less than half the estimated flight speed for various species of African *Anopheles* and *Mansonia*. It has been suggested that the sandfly also contributes to the spread of the etiological agent of leishmaniasis (Killick-Kendrick et al., 1984). Like other sandfly species, *P. ariasi* is an opportunistic species in its choice of host, so the proportions of blood meals taken from different mammals varies according to their availability at each capture site, although it appears to have a preference for dogs over humans (Guy et al., 1984; Alexander and Maroli, 2003).

Phlebotomus (La) ariasi is present in Algeria, Spain, France, Morocco, Portugal and Tunisia; in Italy it has only been found in

the north (Rioux et al., 1964; Croset et al., 1978). Maximum densities for this species are associated with the coolest and most humid Mediterranean bioclimatic zone (supra-Mediterranean) (Aransay et al., 2004), although they have also been found in semi-arid Mediterranean bioclimates (Morillas-Márquez et al., 1991).

Phlebotomus chadlii has been described from male specimens in Tunisia, in the Gafsa area, located in the semi-arid Mediterranean bioclimate (Rioux et al., 1966). Recent descriptions have been made of the female from Tunisia (Chamkhi et al., 2006), in Bahra, in the Kef area, also in a semi-arid Mediterranean bioclimate. *Phlebotomus ariasi* has also been observed in Tunisia in the sub-humid and semi-arid Mediterranean bioclimates (Croset et al., 1966).

Despite this wide geographical range, very little is known about the population structure of *P. ariasi*, although limited studies have been performed by analysis of cuticular hydrocarbons, isoenzymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Kamhawi et al., 1987; Pesson et al., 1991; Martín-Sánchez et al., 2000). Comparative analysis of sequences of mitochondrial genes such as cytochrome *b* (Cyt *b*) has provided useful markers for intra-specific variability in studies on *P. perniciosus*, *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus papatasi* (Esseghir et al., 2000; Pesson et al., 2004; Hamarsheh et al., 2007; Barón et al., 2008). Knowledge of the

Table 1

Geographical origin and other data on the 133 *Phlebotomus ariasi* for which the extreme 3' end of the Cyt *b* gene was sequenced. Three males of *Phlebotomus (Larrousius) chadlii* were caught in Ain Zaatout (two) and Nara (one), Aurès region, Algeria.

Number and sex	Country, region and location (province)	Months/year	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Method of capture
<i>Portugal</i>						
4M	Alto Douro, Freixo de Espada à Cinta	September/1992	41° 05' N	6° 54' W	275	CDC
4M	Alto Douro, Nagozelo do Douro	August/1997	41° 11' N	7° 25' W	391	CDC
1M	Arrábida, Lapa do gato	October/2008	38° 27' N	9° 00' W	266	Electrical aspirator
1M	Arrábida, Lapa do gato	October/2009	38° 27' N	9° 00' W	266	Electrical aspirator
1M	Arrábida, Lapa do gato	June/1989	38° 27' N	9° 00' W	266	Electrical aspirator
<i>Spain</i>						
1M	Andalucía, Aracena (Huelva)	April–October/1995	37° 54' 0'' N	6° 33' 00'' W	730	Sticky trap
1F	Andalucía, Rio Tinto (Huelva)	June–October/1995	37° 41' 00'' N	6° 35' 00'' W	415	Sticky trap
1M and 1F	Andalucía, Valdelamusa (Huelva)	August/2002	37° 47' 08'' N	6° 52' 18'' W	535	CDC
5F	Andalucía, Benamahoma (Cádiz)	July/2003	36° 45' 52'' N	5° 27' 57'' W	500	CDC
1F	Andalucía, Sierra Montejaque (Málaga)	July/2003	36° 44' 00'' N	5° 15' 00'' W	700	CDC
2F	Andalucía, Busquizar (Granada)	June/2006	36° 56' 17'' N	3° 17' 37'' W	1100	Sticky trap
1F	Andalucía, Calahonda (Granada)	November/2008	36° 42' 32'' N	3° 23' 43'' W	50	Sticky trap
2F	Andalucía, Cástaras (Granada)	August/2002	36° 55' 53'' N	3° 15' 14'' W	1010	CDC
3M and 2F	Andalucía, Gualchos (Granada)	November/2008	36° 44' 20'' N	3° 23' 41'' W	425	Sticky trap
5M	Andalucía, Güejar Sierra (Granada)	July–October/2008	37° 09' 25'' N	3° 25' 54'' W	1100	Sticky trap
1F	Andalucía, Hoya Pedraza (Granada)	July–October/2008	37° 06' 52'' N	3° 26' 27'' W	2060	Sticky trap
1M	Andalucía, Las Sabinas (Granada)	July–October/2008	37° 08' 00'' N	3° 25' 54'' W	1650	Sticky trap
1F	Andalucía, Soportujar (Granada)	June/2006	36° 55' 41'' N	3° 24' 11'' W	950	Sticky trap
2F	Andalucía, Trevélez (Granada)	June/2002	36° 59' 43'' N	3° 16' 19'' W	1475	Sticky trap
1F	Andalucía, Venta de Tarugo (Granada)	July/2006	36° 50' 00'' N	3° 12' 51'' W	1080	CDC
1M	Murcia, Verdolay	July/2003	37° 56' 00'' N	7° 55' 00'' W	70	CDC
3M	Madrid, Canencia	May–November/2008	40° 55' 1.9'' N	3° 44' 26'' W	1141	Sticky trap
7M	Madrid, Guadalupe de la Sierra	May–November/2008	40° 47' 0.9'' N	3° 42' 5'' W	842	Sticky trap
7M	Madrid, Paredes de Buitrago	May–November/2008	41° 0' 30'' N	3° 34' 12'' W	1030	Sticky trap
6M	Madrid, San Lorenzo del Escorial	May–November/2008	40° 35' 3'' N	4° 10' 32.9'' W	1028	Sticky trap
9M	Madrid, Peguerinos	May–November/2008	40° 37' 59'' N	4° 14' 22.9'' W	1351	Sticky trap
1M	Madrid, Soto del Real	May–November/2008	40° 45' 15'' N	3° 47' 31.9'' W	921	Sticky trap
8M	Madrid, Santa María de la Alameda	May–November/2008	40° 34' 18'' N	4° 16' 18'' W	1146	Sticky trap
6M and 2F	Cataluña, Sant Jaume de Llierca	July/2002	42° 12' 5'' N	2° 36' 25'' E	200	CDC
<i>France</i>						
3M	Bouches du Rhône, La Valentine	July/2007	43° 18' 19'' N	5° 29' 27'' E	120	CDC
4F	Gard, Mas-Saint-Loup	August/1998	43° 59' 20'' N	3° 39' 48'' E	249	CDC
3F and 1M	Gard, L' Aumède	August/1998	43° 58' 36'' N	3° 40' 10'' E	440	CDC
2M and 2F	Gard, Sumène	July/2007	43° 59' 02'' N	3° 42' 58'' E	210	CDC
4M and 3F	Hérault, Roquebrune	August/1998	43° 29' 47'' N	3° 01' 40'' E	80	CDC
<i>Morocco</i>						
10M and 6F	Marrakech, L' Oukaïmeden	2009	31° 12' 21'' N	7° 51' 51'' W	2613	CDC
<i>Algeria</i>						
2M	Aurès, Ain Zaatout	September/2007	35° 08' 25'' N	5° 49' 49'' E	930	CDC
1F	Aurès, Menaa	September/2007	35° 10' 00'' N	5° 59' 59'' E	910	CDC

F, female; M, male.



biogeography and genetic relationships between populations of *P. ariasi* may help to achieve a greater understanding of the significance of this species in the epidemiology of leishmaniasis caused by *L. infantum*. It is characterized by patchy distribution in the form of micro-foci, among which there are marked differences in the prevalence/incidence of the canine and human diseases (Marty et al., 2007; Martín-Sánchez et al., 2009). Moreover, the existence of races – or even sibling species – which are only distinguishable via molecular methods, could also influence the vectorial capacity of *P. ariasi*. In this study, we use analysis of the *Cyt b* gene sequence in order to examine the genetic diversity within and between *P. ariasi* populations and analyze its epidemiological implications.

2. Materials and methods

2.1. Study areas

The geographical locations from which sandflies were sampled are shown in Table 1 and Fig. 1.

2.2. Collection and morphological identification of specimens

Sandflies were captured with Centers for Disease Control (CDC) light traps, electric aspirators or sticky traps and preserved in liquid nitrogen at -20°C or in 70% alcohol until morphological and molecular identification occurred. They were slide-mounted in Berlese fluid following dissection and morphologically identified based on external and internal characters of the head and

genitalia according to the keys of Gil Collado et al. (1989) and Gállego et al. (1992). To differentiate between *P. ariasi* and *P. chadlii* we followed Rioux et al. (1966), Croset et al. (1966) and Chamkhi et al. (2006) and proceeded as follows: (i) for males: the morphology of the aedeagus is quite similar in both species so it was not selected for the identification of specimens. We identified the specimens by comparison of the number of setae on the coxite: 16–32 hairs in a tuft for *P. ariasi* versus 37–90 hairs in a group for *P. chadlii*. (ii) The identification of females was based on several characters of the spermathecae: the thin distal part of the spermathecal ducts is very short in *P. chadlii* (1/4 of the duct length), and longer for *P. ariasi*. The basal enlarged part of the spermathecal ducts resembles a net in *P. ariasi* and is smooth in *P. chadlii* (Fig. 2).

2.3. Sandfly DNA extraction

The DNA of each specimen morphologically identified as *P. ariasi* or *P. chadlii* was extracted from the thorax and the attached anterior abdomen, using the RealPure kit for genomic DNA extraction from REAL (Spain; Ref RBMEG01). The precipitated pellet was resuspended in 20 μl of bi-distilled water and kept at -20°C until use.

2.4. PCR amplification

PCR was used to amplify a fragment containing the 3' end of the mitochondrial gene *Cyt b* following the methodology described by Essegir et al. (1997). For the specimens in which this PCR did not

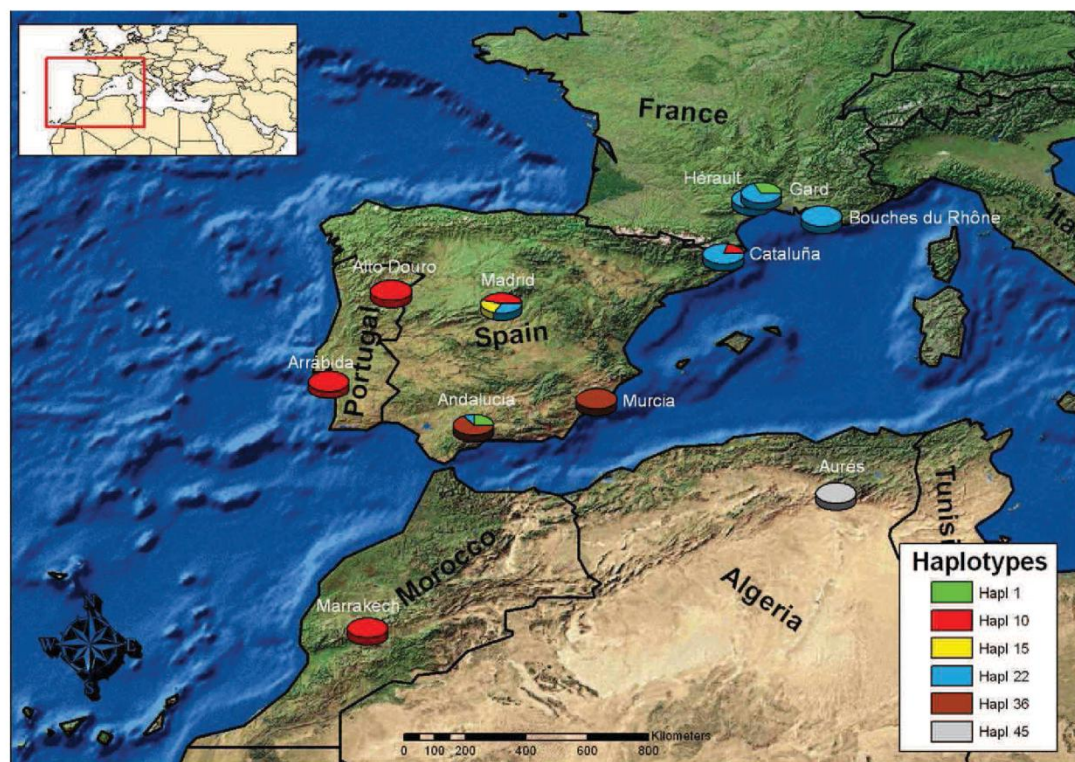


Fig. 1. Map of the area showing the geographical distribution of the different capture locations and the diversity of *Phlebotomus ariasi* haplotypes identified in this study. Only the five most frequent haplotypes of European lineage are shown.

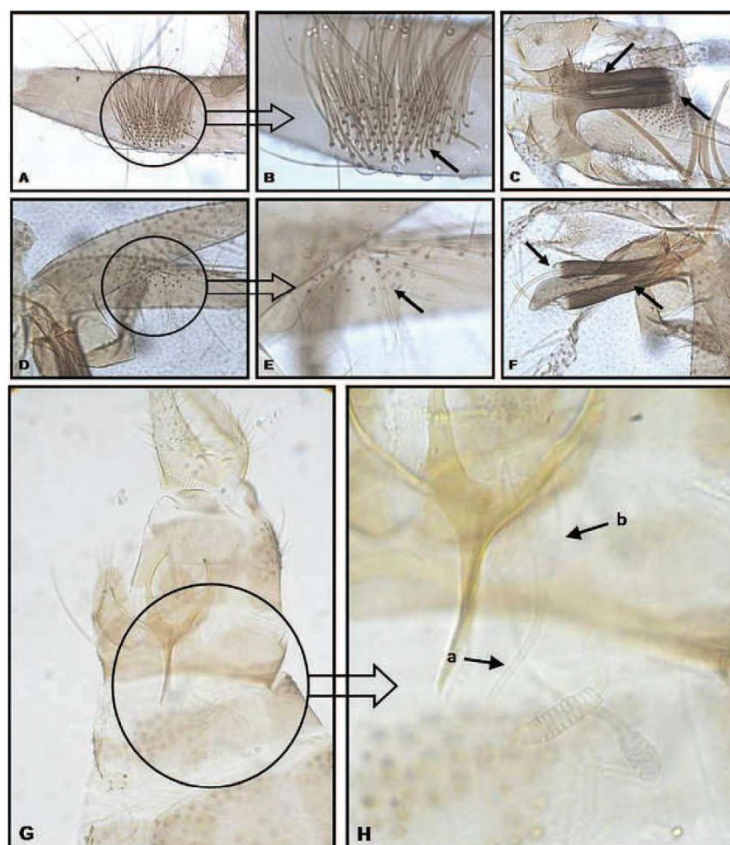


Fig. 2. Comparison of the number of setae on the coxite (arrow) for *Phlebotomus chadlii* (A and B) and *Phlebotomus ariasi* (D and E) males. The morphology of the aedeagus (arrows) is quite similar in both species (C, F, respectively). Spermathecal ducts (a) and basal enlarged part of the spermathecal ducts (b) in *P. ariasi* (G and H). We have not identified any female *P. chadlii*.

work, an internal fragment was amplified with the newly designed primers ParRe 5'CTCGATTTCGTTATGATA3' and ParFw 5'CCTA-TGCTATTTTACGTT3' under the following conditions: an initial denaturation at 94 °C for 5 min; followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, 43 °C for 30 s, 72 °C for 1 min 30 s; and a final extension at 72 °C for 5 min. On occasions, a nested-PCR had to be performed, which was carried out with 2 µl of the product of the first PCR using the same combination of primers and conditions as for the first PCR. Several precautions were taken to avoid cross-contamination between samples, including the use of separate rooms for DNA extraction processes, mixing of reagents for PCR excluding DNA and development of results; as well as dividing reagents into small aliquots, frequent glove changes and the use of negative controls in approximately 30% of the DNA extraction processes (a tube containing water) and in all PCR amplification processes (a tube containing no DNA).

2.5. Sequencing and comparative sequence analysis

PCR products were directly sequenced in both directions using the primers used for DNA amplification. Sequences were edited and aligned to identify haplotypes (= unique sequences) using Clustal-X version 1.81 software and manually adjusted, if necessary. When sequence ambiguities were found, we repeated the

amplification and sequencing process in both directions. Phylogenetic analysis was performed using PHYLIP version 3.65 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>). A *P. (La) neglectus* male from the Drama area in Greece, and a *P. (La) longicuspis* from Morocco were used independently as outgroups. We used the bootstrap as a measure of support or stability of the clades; to be considered sufficiently robust the clades had to have a bootstrap percentage greater than or equal to 50%. The phylogenetic analysis was carried out using two different methods, parsimony analysis and analysis based on distance matrices; for the latter we used the F84 model of nucleotide substitution (the default method) with both neighbor-joining (NJ) and unweighted pair-group method using an arithmetic average (UPGMA) methods of clustering. The F84 model incorporates different rates of transition and transversion, and different frequencies of the four nucleotides; in addition to this, where one or both sequences contain at least one of the other ambiguous codons such as Y, R, etc., the program performs a maximum likelihood calculation. We carried out ordinary parsimony analysis using the DNAPARS program, which searches for the most parsimonious tree via a heuristic algorithm; in this analysis, codon positions were unweighted and transitions and transversions are also equally weighted. For intra-specific analyses, statistical parsimony in TCS (version 1.21) software was used. TCS is a Java computer

[illegible]



of approximately 500 bp in the agarose gel. Having sequenced, compared and deleted the bp most closely located to the primers, we worked with a sequence of 467 bp.

Comparative analysis of sequences allowed us to identify 45 *P. ariasi* haplotypes (Table 2) defined by 56 polymorphic sites (Table 3). Twenty sites were found to be parsimoniously informative, occurring in more than one haplotype. The two *P. chadlii* haplotypes identified differed only at position 208, being an A/G transition. *P. chadlii* differs from *P. ariasi* H10 by 15 bp (eight transitions, four transversions and three indels) and from *P. ariasi* H45 by 25 bp (17 transitions, five transversions and three indels).

All of the sequences are available in GenBank under Accession codes HM131079–HM131125. The AT content of the sequences is 78%, similar to that indicated for other *Phlebotomus* spp. We used the program ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>) to analyze the sequences of the 45 haplotypes. The program recognized within all of them open reading frame (ORF) regions with up to six stop codons; the first stop codon appears at position 292 in all sequences except haplotype 32. Given that we only

3.2. Comparative sequence analyses

In the 133 *P. ariasi* and three *P. chadlii* specimens sequenced, PCR amplification of the 3' end of the Cyt *b* gene produced a band

[illegible]

^a Groups (I, II, III and IV) separated in the phylogenetic tree presented in Fig. 3. The sequences of haplotypes H06, H14, H16, H23, H28, H32, H35 and H41 have been confirmed twice in both directions. CD1 and CD2 are *P. chadlii* haplotypes. Y = C or T, W = A or T, M = C or A, S = C or G, K = T or G.

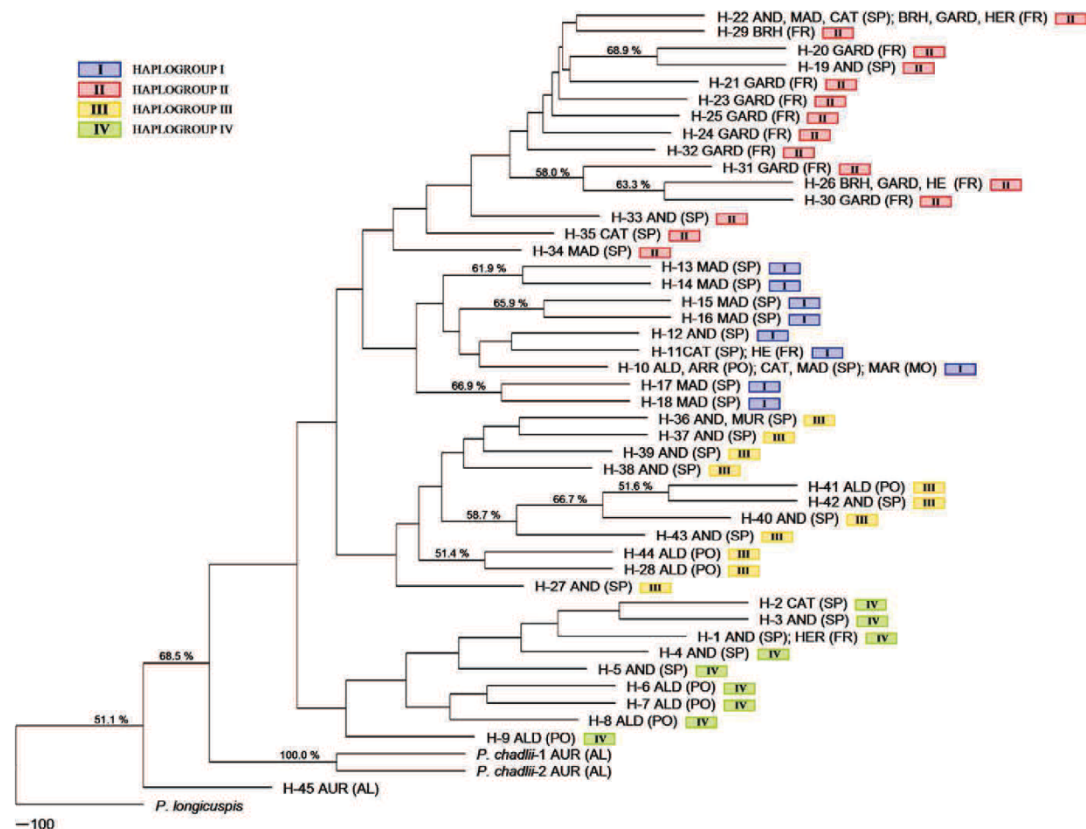


Fig. 3. Phylogenetic tree based on mtDNA Cyt *b* sequence data and obtained by distance analysis – F84 model with a neighbor-joining method of clustering. *Phlebotomus longicuspis* is used as an outgroup. The numbers above the branches are bootstrap percentages (1000 replications) for clades supported above the 50% level. AND, Andalucía; CAT, Cataluña; MAD, Madrid; MUR, Murcia; (SP, Spain); BRH, Bouches du Rhône; GARD, Gard; HER, Hérault; (FR, France); ALD, Alto Douro; ARR, Arrábida; (PO, Portugal); MAR, Marrakech; (MO, Morocco); AUR, Aurès; (AL, Algeria).

sequenced the 3' end of Cyt *b*, it is logical that we did not find any start codons. An analysis performed with the BLAST program confirmed the similarity of our sequences to the sequences of the Cyt *b* 3' region of other sandfly species (similarity always greater than 98%) and other insects such as *Aedes albopictus* (97%).

3.2.1. Inter-specific analyses

Using *P. longicuspis* as an outgroup, the topology of the trees constructed with both distance analysis methods (UPGMA and NJ) and maximum parsimony (MP) analysis are very similar (Figs. 3 and 4, UPGMA tree not shown). *Phlebotomus chadlii* is the sister group of European/Moroccan *P. ariasi* (bootstrap values from 50.3% to 91.5%). The separation of the Algerian haplotype, H45, from the rest of the specimens is also well supported by the bootstrap analysis (51.1–96.6%). When we used *P. neglectus* as an outgroup, the trees constructed with UPGMA and MP were congruent with the three previous ones, whilst the one obtained with NJ identified *P. chadlii* as a sister group of both lineages of *P. ariasi*.

3.2.2. Intra-specific analyses

The European and Moroccan haplotypes are structured in UPGMA and NJ trees into four groups (I, II, III and IV) (three in the MP tree where I and III are mixed) with low bootstrap support; H1, H10, H22 and H36 are incorporated into different groups, H10

in group I, H22 in group II, H36 in group III and H1 in group IV (Figs. 3 and 4). However, when a NJ, UPGMA or MP tree is constructed using only the most frequent haplotypes from each of the four groups, i.e. H1, H10, H22 and H36, the Algerian haplotype, the two haplotypes of *P. chadlii* and *P. longicuspis* as an outgroup, the bootstrap values obtained support the separation of all of the branches (data not shown). The only exception is the low resolution in the separation of H10 from H36 with MP (data not shown).

The Cyt *b* haplotype sequences were further subjected to analysis by statistical parsimony. This algorithm sorted the 136 sequences into three independent networks; two for *P. ariasi* and one for *P. chadlii*. The program collapses sequences into haplotypes and calculates the frequencies of the haplotypes in the sample; these frequencies are used to estimate haplotype outgroup probabilities, which correlate with haplotype age. In the network of European and Moroccan haplotypes of *P. ariasi*, H10 is the oldest ancestral haplotype (Fig. 5), from which the rest would have been derived by mutation.

3.2.3. Analyses of the geographical distributions of specific *P. ariasi* haplotypes

The most frequent *P. ariasi* haplotype is H10 (Table 2), representing 26% of the sandflies analyzed, which is distributed in

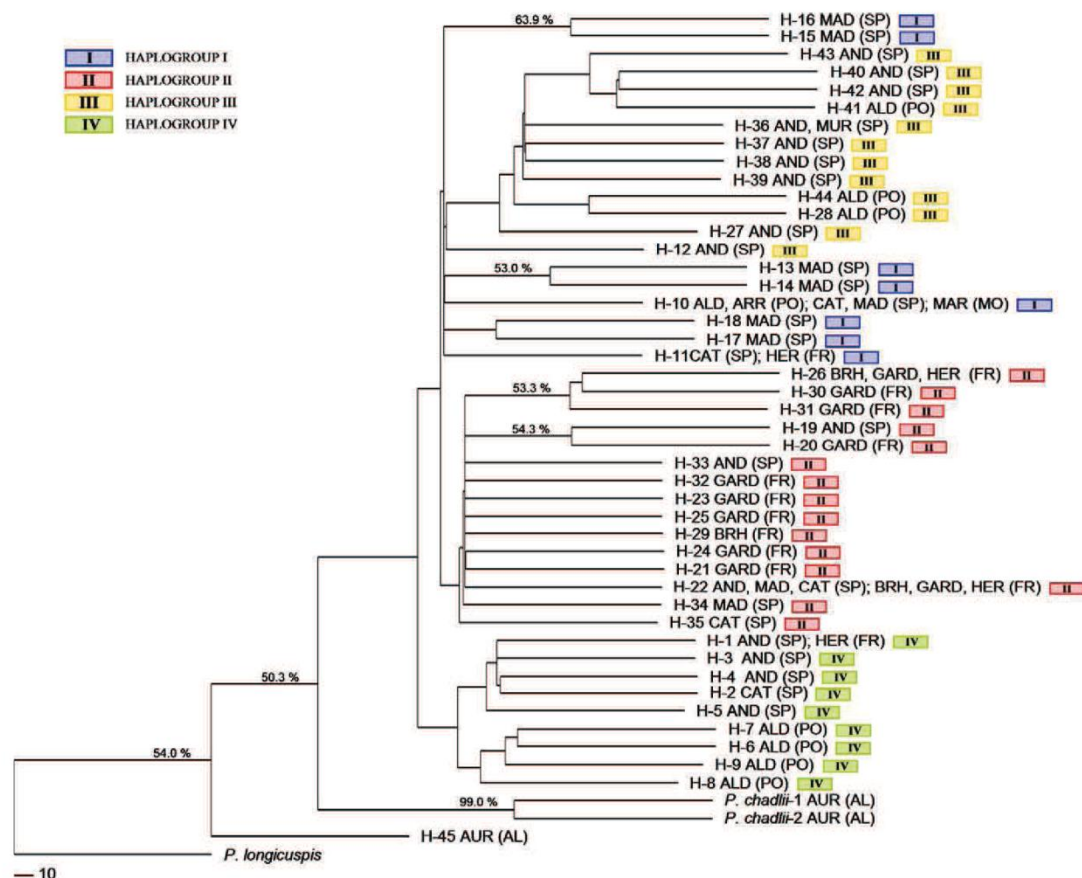


Fig. 4. Phylogenetic tree based on mtDNA *Cyt b* sequence data and obtained by the maximum parsimony method. *Phlebotomus longicuspis* is used as an outgroup. The numbers above the branches are bootstrap percentages (1000 replications) for clades supported above the 50% level. AND, Andalucía; CAT, Cataluña; MAD, Madrid; MUR, Murcia; (SP, Spain); BRH, Bouches du Rhône; GARD, Gard; HER, Hérault; (FR, France); ALD, Alto Douro; ARR, Arrábida; (PO, Portugal); MAR, Marrakech; (MO, Morocco); AUR, Aurès; (AL, Algeria).

northern Spain (Cataluña and Madrid), Morocco and Portugal, both in the Arrabida and in the Alto Douro region. The second most frequent is haplotype 22, which makes up 17% of the sequences, which is distributed around Spain (Andalusia, Catalonia and Madrid) and in all of the French populations studied (Table 2). These haplotypes are closely related and only have 1 bp difference: a C/T transition at position 13 (Table 3). The next most common haplotype is H36 (9%), with a geographical distribution limited to the Spanish regions of Andalusia and Murcia. It differs from haplotype 22 by 4 bp: three transitions and one transversion (positions 13 C/T, 260 A/G and 387 T/C, and 115 T/A, respectively), and from haplotype 10 by 3 bp: one transversion (T/C at position 115) and two transitions (A/G at position 260 and T/C at position 387) (Table 3). Fig. 1 shows the most frequent haplotypes at each of the locations researched. Haplotype 44, identified in the Portuguese Alto Douro region, differs by up to 11 bp from other haplotypes such as H2, H3, H4 and H8, the latter also being from Alto Douro (Table 3).

In Algeria we identified a unique haplotype which was not found in any other geographical area: haplotype 45, different in 21 nucleotides from H10 and in 22 from H22, the most frequent haplotypes (Table 3).

4. Discussion

In recent years there has been growing interest in analyzing the geographical variations between populations of different species of *Phlebotomus* by comparing the sequences of various genes such as the ribosomal ITS2 or the mitochondrial ND4 and *Cyt b*. Through this we have widened our knowledge regarding the inter- and intra-specific variation of these small dipterans and its potential implications in the epidemiology of leishmaniasis. So, whilst *P. papatasi*, the main vector of *Leishmania major*, is characterized by poor geographical structuring (Essegir et al., 1997; Hamarshah et al., 2007, 2009; Depaquit et al., 2008), *Paraphlebotomus sergenti*, the main vector of *Leishmania tropica*, is characterized by its high diversity and its structuring into at least four mitochondrial lineages, between which there may be differences in their vectorial capacity (Yahia et al., 2004; Barón et al., 2008). With regard to *P. (La) perniciosus*, the most widespread vector of *L. infantum*, Essegir et al. (1997) and Pesson et al. (2004) discovered the existence of two mitochondrial lineages, “the typical lineage”, found in Morocco, Tunisia, Malta and Italy, and “the Iberian lineage” in southern Spain, and subsequently also found in the rest of Spain and France (Aransay et al., 2003; Perrotey et al., 2005). The above



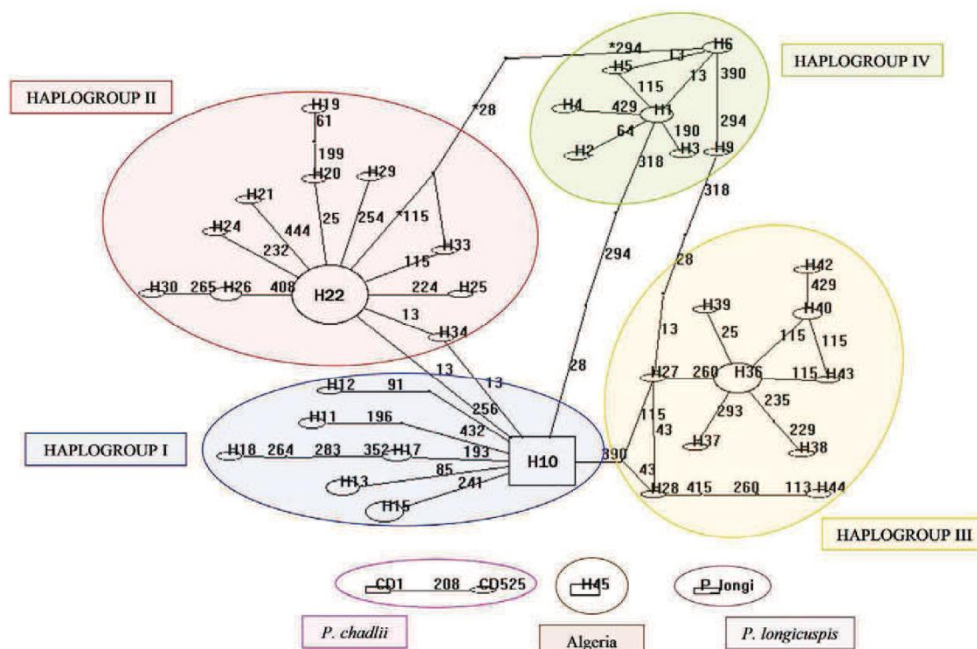
authors suggested that during the Pleistocene Ice Ages, *P. perniciosus* survived in Europe in refugia in southern Spain and Italy, from where there would have been a post-glacial dispersion.

Where *P. (La) ariasi* is concerned, the few studies in existence appeared to indicate a certain heterogeneity and geographical structuring in the populations of this vector species. In Cevennes, southern France, Kamhawi et al. (1987) identified two different populations within this species by analysis of cuticular hydrocarbons, and in Andalusia, southern Spain, Martín-Sánchez et al. (2000), used the RAPD technique to identify another two populations associated with areas with different bioclimatic characteristics.

In this study, we were able to sequence a fragment of the mitochondrial Cyt *b* gene in 133 sandflies morphologically identified as *P. ariasi* and collected over a wide geographical range covering 35 locations in 11 different regions from five countries. We were unable to include specimens from Tunisia and the chances of finding specimens from northern Italy were very low due to the scarcity of this species (Maroli et al., 2008). The intra-specific diversity of *P. ariasi* is high, with 45 haplotypes which differ from each other by one to 26 bases (H44 × H45) and are distributed in two mitochondrial lineages, one of them limited geographically to Algeria and the other widely dispersed across the rest of the Mediterranean countries. The Algerian lineage is characterized by having 13 fixed polymorphisms and is made up of one sole haplotype (H45). According to the molecular calibration of speciation events in *Phlebotomus* and *Larrousius* carried out by Essegir et al. (1997), the separation of these two genetic lineages of *P. ariasi* may have occurred 4.7–2.7 million years ago, with the tectonic reorganization of the eastern Mediterranean sub-region in the Pliocene, a period which was also identified as the isolation point for *P. perniciosus* and *P. tobbi*. In any case, the most surprising factor of all is the

intermediate position between these two *P. ariasi* genetic lineages occupied by the species *P. chadlii*. Congruence between morphological and genetic characters is the best guarantee we can have that the relationship hypothesis we are working with is solid; however, here this does not occur in the case of *P. chadlii* and the Algerian *P. ariasi* genetic lineage. In principle, new species should only be established when there is certainty that, in addition to there being differences of a morphological nature, there are barriers of a structural, ecological or ethological nature which impede hybridization with the species which are phylogenetically closest; evidently the description by Rioux et al. (1966) of *P. chadlii* as a new species only satisfies morphological criteria. On another note, we should also consider the possibility of inter-specific mitochondrial introgression as the cause of this incongruence between the Cyt *b* phylogeny and that based on morpho-taxonomy, although at present we cannot confirm this as we have not studied any genes whose inheritance involves recombination. Pesson et al. (2004) reported the existence in the Moroccan Rif of inter-specific gene introgression between *P. perniciosus* and *P. longicuspis* and a new sibling species. At least two genes with different types of inheritance would need to be sequenced in a larger number of *P. chadlii* individuals and from the Algerian lineage of *P. ariasi* in order to confirm these preliminary results.

The European/Moroccan *P. ariasi* lineage is characterized by being made up of a great diversity of haplotypes (44) which display a certain geographical structuring (Fig. 1). The greatest number of haplotypes is found in Andalusia (Spain), with 16 haplotypes in 31 specimens, 13 of which are only found in this region. Madrid (Spain) follows with nine, Alto Douro (Portugal) and Gard (France) with eight, Herault (France) with six, Catalonia (Spain) with five, Bouches du Rhône (France) with three and finally, Arrábida (Portugal) and Marrakech (Morocco) with one. The nucleotide





diversity of the species varies within each region, with minimum values in Gard (France), where there is one base difference and maximum values in Alto Douro (Portugal), where the haplotypes show up to 11 base differences. In Andalusia (Spain), the haplotypes differ by up to seven nucleotides.

Although the bootstrap values are low, the tree topology (Figs. 3 and 4) shows us how the 44 haplotypes of the European lineage are divided into three to four groups or branches within which Andalusian specimens are always represented, which would support the argument that southern Spain acted as a refugium during the Pleistocene Age and was the centre of post-glacial dispersion (Aransay et al., 2003). However, it has been argued that these traditional phylogenetic methods are based on certain assumptions which make them inappropriate for intra-specific studies but which would, on the other hand, be well represented through network approaches (Posada and Crandall, 2001) of the kind presented in Fig. 5. In natural populations, the ancestral haplotypes are expected to persist in the population and to be sampled together with their descendants. This means that the most frequent haplotypes, i.e. H10, H22, H36 and H1, have probably been present in the population for a long time, and around these a group of new mutants has formed, which allows us to recognize the groups outlined in the traditional phylogenetic trees (Figs. 2 and 3). In the network, H10 is indicated as the oldest ancestral haplotype; its absence in Andalusia contradicts the previous hypothesis, although H12 is in fact present, one of the haplotypes probably derived from H10 by mutation, which would reflect its presence in this region to a certain degree.

We were unable to detect any fixed polymorphisms which could characterize any of these branches within the European lineage, perhaps because the gene flow between adjacent populations is high. A study performed with the RAPD technique confirmed an effective migration rate on a scale of one to four between Iberian populations of *P. ariasi*; Moroccan populations were very similar to some of the Iberian ones (Gálvez-Segovia et al., 2001). Similarly, the polymorphism of *L. infantum* in southern Spain, with 20 identified zymodemes, is the most widely recognized (Martín-Sánchez et al., 2004). The polymorphism of the vector in each focus of leishmaniasis may be conditioning the polymorphism of the parasite.

The species *P. ariasi* is widely distributed across the Iberian Peninsula and, in general, shares its habitat with *P. perniciosus* under sympatric conditions, sometimes acting together as vectors in the same foci (Guilvard et al., 1996; Morillas et al., 1996). In this study, *P. ariasi* was captured at altitudes ranging from sea level up to 2613 m and had a general tendency towards being captured at greater altitudes in more southerly latitudes. Both species vary greatly in relative abundance and density in the various locations studied. The relative abundance of *P. ariasi* varied from 0.28% in Rio Tinto, western Andalusia to 90.9% in Las Sabinas, in Sierra Nevada, at an altitude of 1650 m. The highest density values were detected in Freixo de Espada à Cinta, Alto Douro with 28.67 specimens/CDC trap/night and in Las Sabinas, Andalusia with 17.81 sandflies/m². Likewise, in the French town of La Valentine, *P. perniciosus* is the most abundant species and *P. ariasi* is in the minority, whilst the relative importance of the two species is inverted in Sumène. However, these findings may have been influenced by the fact that we were actively searching for locations in which the species *P. ariasi* would be represented. Furthermore, we are aware that the capture method may affect the number, sex ratio and species of insect captured, and therefore also the distribution values for a particular species (Lucientes-Curdi et al., 1991; Gállego et al., 1992). In any case, there is no doubt regarding the vectorial capacity of this species, which has been found infected by various *L. infantum* zymodemes in Andalusia, Arrábida, Cataluña, Alto Douro, Gard-Cevennes, Niza-Alpes Maritimes, and Taounate (Alves-Pires, 1984; Rioux et al., 1984; Izri et al., 1992; Guilvard

et al., 1996; Morillas et al., 1996; Guessous-Idrissi et al., 1997; Pratlong et al., 2004; Marty et al., 2007), even in foci where it was scarcely represented. All of these foci of infection would involve the European lineage of *P. ariasi*. To date in Algeria, *P. ariasi* has not been identified as a vector of *L. infantum*, although both *P. perniciosus* and *P. perfiliewi* have been found infected by various different zymodemes (Harrat et al., 1996). However, in this country, *P. ariasi* is a probable vector of the Sicilian sandfly fever virus (Izri et al., 2008).

Sero-epidemiological studies carried out in endemic *L. infantum* areas have highlighted the heterogeneous distribution of canine leishmaniasis, with prevalences varying from 0% to 34.6% (Acedo-Sánchez et al., 1996; Morillas et al., 1996; Fisa et al., 1999). Likewise, the appearance of human cases is characterized by patchy geographical distribution. Genetic divergence between vector species can involve genes which affect vectorial capacity, the best known example of this being anophelines, which vary dramatically in significance as vectors of malaria. Among sandflies, *Lutzomyia longipalpis* is, without doubt, the most extensively studied species in terms of genetic variability and population structure; it is the main vector of visceral leishmaniasis due to *L. infantum* (= *Leishmania chagasi*) on the American continent and is thought to be a complex formed by three or more sister species with different vectorial roles (Yin et al., 2000; Arrivillaga et al., 2002). In our case, and in light of the current knowledge, it is very difficult to establish whether there may be differences in the vectorial capacity of *L. infantum* between the various haplogroups of *P. ariasi*, or even between haplotypes, which may be responsible, at least to a certain degree, for the epidemiological heterogeneity of the foci of leishmaniasis in which they play a part, although this could be one of the multiple factors involved.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Junta de Andalucía, Spain, (BIO 176 group), Ministerio de Educación y Ciencia, Spain: (CGL2007-66943-102-02-BOS) for financial assistance. Thanks to the Agencia española de cooperación internacional y desarrollo (AECID), Spain, for a post-doctoral fellowship for Franco FAL. We also wish to thank Ezequiel Martínez-Ortega for providing us with some sandflies from Murcia (Spain) and Hubert Ferté and Pierre-Emmanuel Andry for their participation in the capture of French specimens.

References

- Acedo-Sánchez, C., Martín-Sánchez, J., Vélez-Bernal, I.D., Sanchiz-Marín, M.C., Louassini, M., Maldonado, J.A., Morillas-Márquez, F., 1996. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 26, 303–310.
- Afonso, M.O., Cardoso, L., Anastácio, S., Janz, J.G., Semiao-Santos, S., Sousa, S., Rodrigues, J., Rodrigues, M., Alves-Pires, C., 2001. The phlebotomine sandflies of Portugal-XI-ecology of the leishmaniosis vectors in Alijó municipality, Alto Douro region. *Acta Parasitol. Port.* 14, 27–30.
- Alexander, B., Maroli, M., 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 17, 1–8.
- Alves-Pires, C., 1984. *Phlebotomus* of Portugal. I. Natural infestation of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 and *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania* in the zoonotic focus of Arrábida (Portugal). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59, 521–524.
- Aransay, A.M., Ready, P.D., Morillas-Márquez, F., 2003. Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. *Heredity* 90, 316–325.
- Aransay, A.M., Testa, J.M., Morillas-Márquez, F., Lucientes, J., Ready, P.D., 2004. Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol. Res.* 94, 416–420.
- Arrivillaga, J.C., Norris, D.E., Feliciangeli, M.D., Lanzaro, G.C., 2002. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infect. Gen. Evol.* 2, 83–95.
- Barón, S., Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Morales-Yuste, M., Boussaa, S., Morillas-Márquez, F., 2008. Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Trop.* 107, 159–267.
- Chamkhi, J., Guerbouj, S., Ben-Ismaïl, R., Guizani, I., 2006. Description de la femelle de *Phlebotomus (Larrousius) chadlii* Rioux, Juminer et Gibily, 1966 (Diptera:



- Psychodidae). Daprès un exemplaire capturé aux environs du Kef (Tunisie). Parasite 13, 299–303.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol. 9, 1657–1660.
- Croset, H., Rioux, J.A., Juminer, B., Tour, S., 1966. Présence de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 en Tunisie et nouvelle mention de *Phlebotomus chadlii* Rioux, Juminer et Gibily, 1966. Arch. Inst. Pasteur Tunis 43, 547–551.
- Croset, H., Rioux, J.A., Maistre, M., Bayar, N., 1978. Les Phlébotomes de Tunisie (Diptera, Phlebotomidae). Mise au point systématique, chorologique et éthologique. Ann. Parasitol. (Paris) 53, 711–749.
- Depaquit, J., Lienard, E., Verzeaux-Griffon, A., Ferté, H., Bounamous, A., Gantier, J.C., Hanafi, H.A., Jacobson, R.L., Maroli, M., Moin-Vaziri, V., Müller, F., Ozel, Y., Svobodova, M., Volf, P., Léger, N., 2008. Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA. Epidemiological consequences. Infect. Gen. Evol. 8, 159–170.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 305–318.
- Doha, S., Saeta, M.G., 1992. *Leishmania infantum* MON-98 isolated from naturally infected *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae) in El Agamy. Egypt J. Med. Entomol. 29, 891–893.
- Essegir, S., Ready, P.D., Ben-Ismaïl, R., 2000. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larrousius* coincided with the late Miocene–Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. Biol. J. Linn. Soc. 70, 189–219.
- Essegir, S., Ready, P.D., Killick-Kendrick, R., Ben-Ismaïl, R., 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. Insect Mol. Biol. 6, 211–225.
- Fisa, R., Gallego, M., Castillejo, S., Aisa, J.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. Vet. Parasitol. 83, 87–97.
- Gállego, J., Botet, J., Gállego, M., Portús, M., 1992. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. In: Hernández, S., (Ed.), In Memoriam al Prof. Dr. D.F. de P. Martínez Gómez. Publicaciones de la Universidad de Córdoba, pp. 581–590.
- Gálvez-Segovia, F., Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Martínez-Ortega, E., Pesson, B., Sanchiz Marín, M.C., Toledo, A., Morillas-Márquez, F., 2001. Estudio genético de poblaciones de *Phlebotomus ariasi* (Diptera, Phlebotomidae), vector de *Leishmania infantum*, mediante la técnica de RAPD. Acta Parasitol. Port. 8, 107.
- Gil Collado, J., Morillas-Márquez, F., Sanchiz Marín, M.C., 1989. Los flebotomos en España. Rev. San. Hig. Pub. 63, 15–34.
- Guernaoui, S., Pesson, B., Boumezzough, A., Pichon, G., 2005. Distribution of phlebotomine sandflies, of the subgenus *Larrousius*. Morocco Med. Vet. Entomol. 19, 111–115.
- Guessous-Idrissi, N., Madani, A., Rhalem, A., Riyad, M., Sahibi, H., Dehbi, F., Bichichi, M., Essari, A., Berrag, B., 1997. Epidemiology of human visceral leishmaniasis in Taounate, a northern province of Morocco. Parasite 4, 181–185.
- Guilvard, E., Gallego, M., Moreno, G., Fisa, R., Rispail, P., Pratlong, F., Martínez-Ortega, E., Gállego, J., Rioux, J.A., 1996. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera-Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne). Parasite 3, 191–192.
- Guy, M.W., Killick-Kendrick, R., Gill, G.S., Rioux, J.A., Bray, R.S., 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 In the Cévennes by bloodmeal analyses. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 449–458.
- Hamarsheh, O., Presber, W., Al-Jawabreh, A., Abdeen, Z., Amor, A., Schönan, G., 2009. Molecular markers for *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) and their usefulness for population genetic analysis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 103, 1085–1086.
- Hamarsheh, O., Presber, W., Abdeen, Z., Sawalha, S., Al-Lahem, A., Schönan, G., 2007. Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. Med. Vet. Entomol. 21, 270–277.
- Harrat, Z., Pratlong, F., Belazzoug, S., Dereure, J., Deniau, M., Rioux, J.A., Belkaid, M., Dedet, J.P., 1996. *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90, 625–629.
- Izri, A., Temmam, S., Moureau, G., Hamrioui, B., de Lamballerie, X., Charrel, R.N., 2008. Sandfly fever Sicilian virus, Algeria. Emerg. Infect. Dis. 14, 795–797.
- Izri, M.A., Marty, P., Rahal, A., Lelièvre, A., Ozon, C., Baldelli, G., Presiozo, J., Haas, P., Le Fichoux, Y., 1992. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 naturally infected by promastigotes in the region of Nice (France). Bull. Soc. Pathol. Exot. 85, 385–387.
- Kamhawi, S., Molyneux, D.H., Killick-Kendrick, R., Milligan, P.J., Phillips, A., Wikes, T.J., Killick-Kendrick, M., 1987. Two populations of *Phlebotomus ariasi* in the Cévennes focus of leishmaniasis in the south of France revealed by analysis of cuticular hydrocarbons. Med. Vet. Entomol. 1, 97–102.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Bailly, M., Guy, M.W., Wikes, T.J., Guy, F.M., Davidson, I., Knechtli, R., Ward, R.D., Guilvard, E., et al., 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 555–572.
- Léger, N., Depaquit, J., 1999. Les phlébotomes. In: Dedet, J.P. (Ed.), Les Leishmanioses. Universités Francophones, Ellipses Aupelf/Uref, pp. 89–108.
- Léger, N., Depaquit, J., Ferté, H., Rioux, J.A., Gantier, J.C., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Michaelides, A., Christophi, N., Economides, P., 2000. Les Phlébotomes (Diptera-Psychodidae) de l'île de Chypre. II-Présence de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Nicolle, 1908 (zymodème MON1) chez *Phlebotomus* (*Larrousius*) *tobbi* Adler et Theodor, 1930. Parasite 7, 143–146.
- Léger, N., Gramiccia, M., Gradoni, L., Madulo-Leblond, G., Pesson, B., Ferté, H., Boulanger, N., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., 1988. Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 419–420.
- Lucientes-Curdi, J., Benito-de-Martín, M.I., Castillo-Hernández, J.A., Orcajo-Teresa, J., 1991. Seasonal dynamics of *Larrousius* species in Aragon (N.E. Spain). Parasitologia 33, S381–S386.
- Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., 1987. Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 596–598.
- Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Troiani, M., Ascione, R., 1994. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* with MON 72 zymodeme of *Leishmania infantum* in the Campania region of Italy. Acta Trop. 57, 333–335.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capella, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobello, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. Trop. Med. Int. Health 13, 256–264.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F., 2004. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 98, 228–232.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Pesson, B., Morillas-Márquez, F., 2000. Genetic polymorphism in sympatric species of the genus *Phlebotomus*, with special reference to *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera, Phlebotomidae). Parasite 7, 247–254.
- Martín-Sánchez, J., Guilvard, E., Acedo-Sánchez, C., Wolf-Echeverry, M., Sanchiz-Marín, M.C., Morillas-Márquez, F., 1994. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). Int. J. Parasitol. 24, 405–408.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F., 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. Emerg. Infect. Dis. 15, 795–798.
- Martín-Sánchez, J., Ruiz Martínez, F., Fernández, Salinas, de Lecea, J.M., Sánchez Rabasco, C., Acedo-Sánchez, C., Sanchiz-Marín, M.C., Delgado Florencio, V., Morillas-Márquez, F., 1996. *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 from southern Spain: characterisation of the strains from human visceral and cutaneous leishmaniasis and from sandflies; with a numerical analysis of the isoenzymatic data. Syst. Parasitol. 33, 177–182.
- Marty, P., Izri, A., Ozon, C., Haas, P., Rosenthal, E., Del Giudice, P., Godenir, J., Coulibaly, E., Gari-Toussaint, M., Delaunay, P., Ferrua, B., Haas, H., Pratlong, F., Le Fichoux, Y., 2007. A century of leishmaniasis in Alpes-Maritimes France. Ann. Trop. Med. Parasitol. 7, 563–574.
- Morillas, F., Sánchez Tabasco, F., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocaña-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchiz-Marín, M.C., 1996. The Leishmaniasis in the focus of Axarquía region (Málaga province, southern Spain) A survey on man, dog and vector. Parasitol. Res. 82, 569–570.
- Morillas-Márquez, F., Guevara Benítez, D.C., Úbeda Ontiveros, J.M., González Castro, J., 1983. Annual fluctuations of *Phlebotomus* populations (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Granada (Spain). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 58, 625–632.
- Morillas-Márquez, F., Sanchiz Marín, M.C., Martín-Sánchez, J., Acedo-Sánchez, C., 1991. On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Almería in southeastern Spain. Parasitologia 33, 437–443.
- Perrotey, S., Mahamdallie, S., Pesson, B., Richardson, K.J., Gállego, M., Ready, P.D., 2005. Postglacial dispersal of *Phlebotomus perniciosus* into France. Parasite 12, 283–291.
- Pesson, B., Ready, J.S., Benadenni, I., Martín-Sánchez, J., Essegir, S., Cadi-Soussi, M., Morillas-Márquez, F., Ready, P.D., 2004. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. Med. Vet. Entomol. 18, 25–37.
- Pesson, B., Wallon, M., Floer, M.T., Kristensen, A.R., 1991. Isoenzymatic studies of Mediterranean populations of sandflies of the subgenus *Larrousius*. Parasitologia 33 (Suppl.), 471–476.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends Ecol. Evol. 16, 37–45.
- Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.P., 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. J. Clin. Microbiol. 42, 4077–4082.
- Rioux, J.A., Coluzzi, M., Bain, O., Baudouy, J.P., 1964. Présence de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 en Italie du Nord. Bull. Soc. Pathol. Exot. 57, 966–971.
- Rioux, J.A., Jarry, D.M., Lanotte, G., Maazoun, R., Killick-Kendrick, R., 1984. Ecology of leishmaniasis in Southern France. 18. Enzymatic identification of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 isolated from *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, spontaneously infected in the Cévennes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 331–333.
- Rioux, J.A., Juminer, B., Gibily, H., 1966. *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *chadlii* n. sp. (Diptera-Psychodidae). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 41, 83–89.
- Rioux, J.A., Killick-Kendrick, R., Perieres, J., Turner, D.P., Lanotte, G., 1980. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 13. Middle slopes of hillsides as sites of maximum risk of transmission of visceral leishmaniasis in the Cévennes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 55, 445–453.
- Volf, P., Myskova, J., 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trends Parasitol. 23, 91–92.



1346

F.A.L. Franco et al. / International Journal for Parasitology 40 (2010) 1335–1346

Yahia, H., Ready, P.D., Hamdani, A., Testa, J.M., Guessous-Idrissi, N., 2004. Regional genetic differentiation of *Phlebotomus sergenti* in three Moroccan foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Parasite* 11, 189–199.

Yin, H., Norris, D.E., Lanzaro, G.C., 2000. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide. *Maxadilan*. *Insect Mol. Biol.* 9, 309–314.



3.3. Artículo 3: Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: Implications for the control of the disease.

Mapas de riesgo para la presencia y ausencia de *Phlebotomus perniciosus* en un área endémica de leishmaniosis en el sur de España: Implicaciones para el control de la enfermedad.

Barón S.D., Morillas-Márquez F., Morales-Yuste M., Díaz-Sáez V., Irigaray C.,
Martín-Sánchez J.

Parasitology (2011); 138(10): 1234-44.

Factor de Impacto: Año de publicación - 2'961 1^{er} cuartil (8/34 en Parasitology).

Actual – 2'355 2^o cuartil (14/35 en Parasitology).

Resumen: El objetivo de este estudio fue la construcción de mapas de riesgo para la presencia del vector dominante de *Leishmania infantum*, *P. perniciosus*, y se comprobó su utilidad (a) para predecir el riesgo de la leishmaniosis canina y (b) para definir medidas eficaces de control de la leishmaniosis. Se obtuvieron datos de la presencia/ausencia de *P. perniciosus* en 167 puntos de muestreo en el sur de España, de la que también se recogieron una serie de datos ecológicos y climáticos. La probabilidad de presencia de *P. perniciosus* se estimó como una función de estas variables ambientales, y se generaron mapas de riesgo espaciales. La altitud, el uso del terreno y las características de los agujeros de drenaje (con o sin tubos de PVC) se mantuvieron como los únicos predictores de la distribución de este vector. Las características de los agujeros de drenaje en muros de contención, con o sin tubos de PVC, produjeron variaciones significativas en la probabilidad de presencia de *P.*



perniciosus, que variaron de 2'3 a 91'8% en ausencia de tubos de PVC, y de 0,4 a 66,5% si todos los agujeros tuvieran tubos de PVC. Se concluyó que el uso de tubos de PVC en los agujeros de drenaje podría ayudar a reducir la transmisión de la leishmaniosis.



Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease

S. D. BARÓN¹, F. MORILLAS-MÁRQUEZ¹, M. MORALES-YUSTE¹, V. DÍAZ-SÁEZ¹, C. IRIGARAY² and J. MARTÍN-SÁNCHEZ^{1*}

¹ Parasitology Department, Faculty of Pharmacy, Granada University, Cartuja Campus S/N, 18071 Granada, Spain

² Civil Engineering Department, Higher Technical School of Civil Engineers, Granada University, Fuentenueva Campus S/N, 18071 Granada, Spain

(Received 2 March 2011; revised 9 May and 11 May 2011; accepted 12 May 2011)

SUMMARY

The aim of this study was to construct risk maps for the presence of the dominant *Leishmania infantum* vector, *P. perniciosus*, and check its usefulness (a) to predict the risk of canine leishmaniasis and (b) to define effective leishmaniasis control measures. We obtained data for the presence/absence of *P. perniciosus* at 167 sampling sites in southern Spain, from which we also took a series of ecological and climate-related data. The probability of *P. perniciosus* presence was estimated as a function of these environmental variables and generated spatial risk maps. Altitude, land use and drainage hole features (with or without PVC piping) were retained as the only predictors for the distribution of this vector species. Drainage hole features in retaining walls, with or without PVC piping, produce significant variations in the probability of *P. perniciosus* presence, varying from 2.3 to 91.8% if PVC piping is absent and from 0.4 to 66.5% if all holes have PVC piping. It was concluded that the use of PVC piping in drainage holes could help to reduce leishmaniasis transmission.

Key words: *Phlebotomus perniciosus*, *Leishmania infantum*, environmental variables, spatial risk maps, control of leishmaniasis.

INTRODUCTION

In Spain, *Leishmania infantum* is the only species responsible for human cutaneous and visceral leishmaniasis and also for canine leishmaniasis. Although cases of infection have been reported in foxes (Fisa *et al.* 1999), rats (Morillas-Márquez *et al.* 1985), equines (Solano-Gallego *et al.* 2003), cats (Martín-Sánchez *et al.* 2007) and some wild animals (Sobrino *et al.* 2008), the role of reservoir is basically played by the dog (Acedo-Sánchez *et al.* 1996; Alvar *et al.* 2004). Species of the *Leishmania* genus are transmitted by hematophagous dipterans of the Phlebotomidae family, from the *Phlebotomus* genus in the Old World and the *Lutzomyia* genus in the New World, displaying certain specificity between the species of *Leishmania* and the subgenus of sandflies which transmit it (Killick-Kendrick, 1990). In Spain, eleven different species of sandflies have been identified (Gil Collado *et al.* 1989; Gállego Berenguer *et al.* 1992; Conesa Gallego *et al.* 1999) and 2 proven *Leishmania infantum* vectors, *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi*, which can act in the same focus in sympatric conditions (Rioux *et al.*

1986; Martín-Sánchez *et al.* 1994). They are found, to a greater or lesser extent, almost throughout the country, and their relative significance as vectors depends on their abundance and density (Guevara-Benitez *et al.* 1978; Morillas-Márquez *et al.* 1983; Gil Collado *et al.* 1989). Transmission of the disease is linked to the presence of the vector, whose distribution is in turn closely related to ecological and bioclimatic factors, thus being sensitive to environmental changes related to human behaviour including climate change (Rispaïl *et al.* 2002; Semenza and Menne, 2009).

Leishmaniasis caused by *L. infantum* is endemic in the province of Granada, with canine seroprevalence values varying from 1.1–20.1% according to the bioclimatic characteristics of the area (Martín-Sánchez *et al.* 2009) and the existence of sporadic cases of human leishmaniasis (Muñoz Hoyos *et al.* 1983). *P. perniciosus* is the most abundant species of the *Phlebotomus* genus and therefore the main vector in this area (Guevara-Benitez *et al.* 1978; Morillas-Márquez *et al.* 2010).

Nowadays, Geographical Position Systems (GPS) and Remote Sensing (RS) are being used to obtain geographical data for epidemiological purposes, whilst Geographical Information Systems (GIS) are employed in order to visualize and analyse these spatial data. These tools are enabling us to study

* Corresponding author: Parasitology Department, Faculty of Pharmacy, Granada University, Cartuja Campus S/N, 18071 Granada, Spain. Tel: +34 958 242094. Fax: +34 958 243862. E-mail: joaquina@ugr.es



environmental relationships and generate maps predicting the behaviour and distribution of certain vector-borne diseases (Eisen and Lozano-Fuentes, 2009; Srivastava *et al.* 2009; Chamaillé *et al.* 2010; Gálvez *et al.* 2010). Our objective was to study the environmental factors associated with *P. perniciosus* presence in southern Granada in order to construct risk maps for the presence and absence of the vector in this province. The results obtained may help to broaden our knowledge of the epidemiology of leishmaniasis by determining the ecological patterns followed by its main vector and provide us with a base upon which to model and predict its distribution. This could help us both to determine the focus of new studies, and to design possible control programmes for this disease, as it allows us to define in a more rational way the most effective measures to be taken in each area.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The south of the province of Granada is an area which spans altitudes ranging from 0 to 3480 m in the space of a few kilometres, thus enabling various bioclimatic levels with different environmental and vegetation features to exist within a narrow geographical range: Thermomediterranean, Mesomediterranean, Supramediterranean, Oromediterranean and Criomediterranean (Rivas Martínez *et al.* 1987). The Thermomediterranean level is defined by an altitude of 0 to 700 m above sea level, with warm temperatures in winter and an average annual temperature of 17–19 °C, and rainfall of 200–300 mm a year. The Mesomediterranean level sits at altitudes of 600–900 m, with rainfall of 600–1000 mm a year, and an average temperature of 13–17 °C. The Supramediterranean covers altitudes of 900–1800 m and an average annual temperature of 8–13 °C, with an annual rainfall of 1000–1600 mm. The Oromediterranean and Criomediterranean levels have average annual temperatures of 4–8 °C and <4 °C respectively, both with annual rainfall of >1600 mm. The lower limits of the Oromediterranean level fall at altitudes of between 1600 and 2000 m, depending on the region, whilst the Criomediterranean level tends to be at above 2700 m in this part of the Iberian Peninsula.

Capture and morphological identification of the sandflies

This study was carried out in the years 2004, 2006 and 2007. Adult sandflies were captured in the month of July, which in our area is characterized by maximum richness of species and high densities of *P. perniciosus* (Morillas Márquez *et al.* 1983). Sticky traps ((A4 sized paper: 29.7 cm × 21 cm) impregnated

with castor oil) were placed for 4 days in typical sandfly resting spots, such as the drainage holes in the retaining walls of roads and houses. This capture method and trap maintenance period minimizes false negatives for *P. perniciosus* presence.

In total, 1694 sticky traps were placed in 167 sampling sites situated at various points in the south of Granada province, such as the Granada coastline, the Alpujarra, the Lecrín valley, and an altitudinal transect from Motril, at sea level, to the University Mountain Refuge in the Sierra Nevada, at an altitude of 2500 metres (Fig. 1). The number of sticky traps placed at each site varied from 5 to 14 per site, depending on the availability of drainage holes in each retaining wall.

Captured specimens were removed from the sticky traps using 96% alcohol and were then conserved in 70% alcohol. After eliminating any remaining traces of oil in a 5% detergent solution, they were placed in Marc André solution and heated to boiling point to clear the external cuticle of the sandfly, after which they were kept at 37 °C for 2 days. Following this they were mounted on slides under a cover-slip using Berlese solution. Morphological classification was carried out in accordance with Gil Collado *et al.* (1989), and Gállego Berenguer *et al.* (1992) via examination under an optical microscope, paying particular attention to the spermatheca in females and the external genitalia in males.

Variables studied

Data were collected from each of the sampling sites via GIS and notes made on-site with a Personal Digital Assistant (PDA) for use as independent variables. Abundance/density data for *P. perniciosus* at the 167 sampling sites was reduced down to data for the presence or absence of this vector, thus generating the dependent variable. Given that this can only have values of 0 or 1, the multivariate statistical technique chosen to estimate the probability of occurrence of the event was logistic regression.

To standardize data collection in our fieldwork with the PDA, we used the program Pendragon Form v. 5.0.7, through which a database was constructed for use by the leishmaniasis group (EDEN-LEI) of the EDEN project (Emerging Diseases in a changing European environment, GOCE-2003-010284). The following data were collected by this method: location of sampling site (geographical coordinates), number of traps placed and collected, meteorological data (rain, wind) and ecological and environmental factors (site relative to settlement, situation of site, site category, aspect, shelter, water course, drainage hole wall features, drainage hole features, hole interior, wetness of holes, vegetation on wall, well present, refuse bin present, bioclimatic level, predominant natural vegetation adjacent zone 0–100 m,

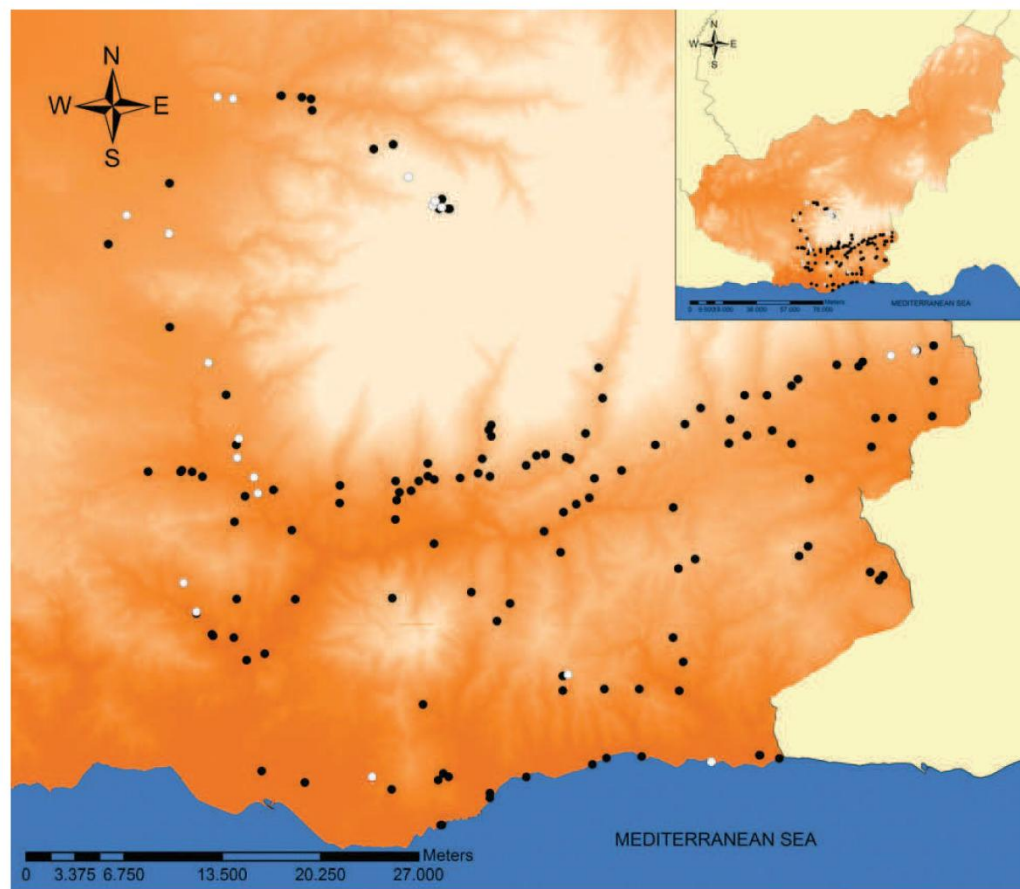


Fig. 1. Map showing the 167 locations where traps were set with white and black dots for drainage hole with or without PVC piping, respectively.

predominant natural vegetation nearby zone 100–1000 m, second predominant natural vegetation nearby zone 100–1000 m; predominant adjacent land cover, second predominant adjacent land cover; presence of different animals in the immediate surroundings). Through GIS we obtained data for altitude, land use (CORINE), slope, Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) and Land Surface Temperature (LST), provided by the Junta de Andalucía [Regional Government of Andalusia] (<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/web/...>) or the European EDEN network within which this study was carried out.

Spatial statistical analysis and maps

Using the SPSS 15.0 software for Windows, univariate logistic regression studies were carried out with all the independent variables plotted against the presence/absence of *P. perniciosus* as the dependent

variable. Particular attention was paid to the detection of collinearity and also interaction or confusion between the independent variables through the construction and comparison of different logistic regression models. In the case of closely correlated variables, we retained the one which was easiest to represent on a map or the most significant one. Continuous variables such as altitude or LST were categorized, and categorical variables were re-categorized in the search for association with the dependent variable. To construct the multivariate model we used all the variables with $P \leq 0.100$ in the univariate study.

In the final model, variables with $P < 0.05$ were retained. The variables which could not be represented in the map were included in the constant of the predictive model. The maps for exposure to *P. perniciosus* were generated with the software package ArcGis 9.2, through the Raster Calculator option, with which we were able to enter the



Table 1. General data on capture and abundance/density of the two vector species, *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi* organized by bioclimatic level

(Pp, *Phlebotomus perniciosus*; Pa, *Phlebotomus ariasi*; other sp., other species of sandflies captured; Dens. PP, density of *P. perniciosus* (no. *P. perniciosus*/m²); Dens. Pa, density of *P. ariasi* (no. *P. ariasi*/m².)

Bioclimatic level	Pp	Pa	Other sp.	% Pp	% Pa	Dens. Pp	Dens. Pa
Thermo-mediterranean	759	73	13 199	5.41	0.52	11.00	1.06
Meso-mediterranean	1381	130	12 688	9.73	0.92	15.82	1.49
Supra-mediterranean	116	22	1641	6.52	1.24	3.87	0.73
Oro-mediterranean	0	0	10	0	0.00	0.00	0.00
TOTAL	2256	225	27 538	7.51	0.75	11.03	1.10

multivariate statistical model obtained into the program. This enabled us to interpolate precise data to surfaces of risk and extrapolate it to a wider area, which in our case is represented by the province of Granada.

In order to check the usefulness of the spatial risk model for the presence and absence of *P. perniciosus* to predict the risk of leishmaniasis in the area, we applied linear regression with the seroprevalence of canine leishmaniasis in 14 localities in southern Granada as the dependent variable and the estimated average risk of presence and absence of *P. perniciosus* in these localities as the independent variable.

RESULTS

Capture and species identification data

Of the 1694 sticky traps placed, a total of 1633 were collected, representing a loss of 3.6%. We captured 30019 sandflies belonging to 6 different species: 5 of the *Phlebotomus* genus (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. sergenti* and *P. alexandri*) and 1 of the *Sergentomyia* genus (*S. minuta*). At least 1 species was captured in 154 of the 167 sites sampled (92.22%). The most abundant species was *S. minuta* (89.90%), which was found in 151 of the 167 sites sampled (90.42%), whilst *P. alexandri* is the least abundant (0.003%) and least common, having been found in only 1 site (0.60%) at the Thermomediterranean bioclimatic level. A total of 2256 specimens were classified morphologically as *P. perniciosus*, representing 7.51% of the total number captured. This species has an average density of 11.03 sandflies/m² and was present in 112 of the 167 sites sampled (67.07%). Both males with typical bifurcated aedeagus and males with an incurved aedeagal tip were classified as *P. perniciosus* (Pesson *et al.* 2004), although the latter category only made up 0.13% of the total number of cases. We identified 225 specimens (0.75%) of the species *P. ariasi*, which we found in 55 of the 167 sites sampled (32.93%), with an average density of 1.10 sandflies/m² (Table 1). With regard to altitude, we captured *S. minuta* in this study at 60–2490 m, *P. perniciosus* at 76–1534 m and *P. ariasi* at 85–1694 m. *P. perniciosus* abundance is

highest in the Mesomediterranean ($P \leq 0.005$) with 9.70%. *P. ariasi* abundance is also greater in the Mesomediterranean than in the Thermomediterranean ($P < 0.001$) but does not show statistically significant differences with the Supramediterranean ($P = 0.187$). At the Oromediterranean level no specimens of any vector species were captured.

Statistical study and construction of predictive models

Univariate logistic regression models were constructed between the dependent variable (*P. perniciosus* presence/absence) and each of the independent variables, finding a notable number of associations (Table 2). Some of the independent variables are closely correlated and cannot be in the same multivariate model.

The multivariate logistic regression analysis shows that the best predictors for *P. perniciosus* presence/absence are altitude (a. 0–384 m, b. 385–768 m and 1154–1537 m, c. 769–1153 m, d. 1538–2691 m), land use (a. other uses, b. urban area) and presence/absence of PVC piping in the drainage holes of retaining walls (a. plastic pipe, b. other holes). The category of 'other holes' includes the following types of holes: unlined, which was the most frequent, having been found at 123 sites, and was initially used as reference, brick lined (8 sites), cement pipe (5), plaster lined (4) and other (2). As there was no statistically significant difference in *P. perniciosus* presence between each of the above types and the unlined holes, they were all included within the reference category.

The altitude and land use variables were obtained via GIS and therefore could be used in the construction of the risk map, whilst the PVC piping variable was recorded with the PDA and had to be included in the constant of the model in order to be represented, for which reason 2 different models were constructed, one with and the other without this variable. In Table 3 and Fig. 2 respectively, we can see the model and the risk map for exposure to *P. perniciosus* depending on the variables of altitude and land use, without taking the type of drainage hole into account. This map shows us the probability of finding this



S. D. Barón and others

1238

Table 2. Possible factors associated with the presence of *Phlebotomus perniciosus* in the Granada province, southeast Spain: univariate analysis by logistic regression

(The elevation classification was based on the altitude ranges of the different bioclimatic levels and sublevels.)

Variable	Trapping sites	Relative likelihood	P
Bioclimatic level	167	—	0.132
Thermo-mediterranean	62	Ref	—
Meso-mediterranean	73	2.407	0.022
Supra-mediterranean	24	2.027	0.189
Oro-mediterranean	8	0.000	0.999
Elevation	167	—	0.001
0–384 m	39	Ref	—
385–768 m	52	2.579	0.034
769–1153 m	41	5.542	0.002
1154–1537 m	24	2.850	0.066
1538–2691 m	11	0.095	0.032
Site relative to settlement	167	—	0.009
Within and edge of settlement	76	Ref	—
Between settlement	91	2.407	—
Slope	167	—	0.044
0–15%	113	Ref	—
16–33%	54	2.150	—
Slope (continuous variable)	167	1.061	0.020
Corine	167	—	0.002
Other land use	150	Ref.	—
Urban zone	17	0.202	—
Land Surface Temperature (LST)	152	—	0.005
≤ 23.6	41	Ref	—
23.7–24.4	37	4.197	0.005
24.5–25	37	4.197	0.005
≥ 25.1	37	3.602	0.01
LST (continuous variable)	152	1.751	0.000
Situation of site	167	—	0.02
Public road	133	Ref	—
Other categories	34	0.400	—
Site category	167	—	0.005
Embankment drain holes above road	107	Ref	—
Embankment drain holes below road	34	5.926	0.005
Other locations	26	0.574	0.207
Cats	167	—	0.085
Not seen	159	Ref	—
Seen	8	0.275	—
Pigeon presence	167	—	0.056
Not seen	162	Ref	—
Seen	5	0.574	—
Farm animals	167	—	0.081
Other animals	136	Ref	—
Equines, cattle, sheep, pigs, goats and rabbits	31	2.347	—
Domestic birds	167	—	0.073
Other animals	157	Ref	—
Chicken, duck, pigeon	10	0.302	—
All animals	167	—	0.070
Absence	102	Ref	—
Presence	65	1.896	—
Refuse bin	167	—	0.008
No	135	Ref	—
Yes	32	0.346	—
Shelter	167	—	0.017
Not sheltered	136	Ref	—
Sheltered	23	0.332	—
Drainage hole features	167	—	0.000
PVC pipe	25	Ref	—
Other hole	142	5.816	—
Unlined (123) + Brick lined (8) + cement pipe (5) + Plaster lined (4) + Other (2)			



Table 2. (Cont.)

Variable	Trapping sites	Relative likelihood	P
Principal vegetation (0–100 m)	167	—	0.026
Garrigue shrubs	130	Ref	—
Grove	22	1.101	0.851
None	8	0.248	0.065
Valley alder	7	0.069	0.015
Land cover	167	—	0.000
Garrigue shrubs, forest	49	Ref	—
Arable	80	1.765	0.174
Gardens	31	0.243	0.004
Other	7	0.331	0.180
Aspect	165	—	0.100
S	42	Ref	—
N	9	0.284	0.096
NE	4	1.065	0.959
E	27	1.014	0.981
SE	23	1.277	0.691
NW	18	0.284	0.033
SW	16	1.538	0.556
W	26	0.414	0.094

Table 3. Multivariate model in which the variable drainage hole features have been excluded due to not being a GIS variable

(This model was used to generate the risk map in Fig. 2. R square of Nagelkerke: 0.322.)

Variable	Trapping sites	Relative likelihood	P
Altitude	167	—	0.000
0–384	39	Ref	—
385–768 and 1154–1537	76	2.631	0.026
769–1153	41	6.477	0.002
1538–2691	11	0.091	0.031
Land use (Corine)	167	—	—
Other	150	Ref	—
Urban zone	17	0.099	0.000

vector in the province of Granada without the type of drainage hole affecting the model. Using the model in Table 4, we then generated 2 risk maps in which the influence of PVC piping on the presence/absence of *P. perniciosus* is established. The first of these maps shows the risk of exposure to *P. perniciosus* in the hypothetical case that PVC piping was used for drainage holes in all retaining walls (Fig. 3), whilst the second shows the risk of exposure in the absence of PVC piping (Fig. 4). These maps show that, all other variables in the model being equal, the probability of encountering *P. perniciosus* in Granada province varies from 2.3% to 91.8% when PVC piping is absent whilst in the opposite scenario (only PVC piping is present), the probability varies from 0.4% to

66.5%. Furthermore, the highest risk of exposure to *P. perniciosus* occurs at altitudes of 769–1153 m, which means that all other variables in the model being equal, the risk is 7.8 times higher than at altitudes of 0–384 m. Altitudes of 1538–2691 m and the use of land as an urban area are both factors that serve to protect against exposure to *P. perniciosus*. Altitude and land use being equal, the lack of PVC piping in drainage holes entails a risk of exposure to *P. perniciosus* which is 5.7 times higher than if the drainage holes had PVC piping in them.

With respect to the validation of the predictive model, the linear regression analysis between the seroprevalence of canine leishmaniasis and the risk of presence/absence of *P. perniciosus* indicates a positive linear association between the two parameters ($P=0.032$), so that an increase in risk of 0.1 would entail an increase in seroprevalence in the area of 2.6% ($R^2=0.272$). The risk among affected localities varies from 0.137 to 0.855 whilst seroprevalence varies from 0 to 40%.

DISCUSSION

Using sticky traps as our capture method, we found that the most common species in the south of Granada province is *S. minuta*, followed by *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. ariasi* and *P. alexandri*. We are aware that the capture method can influence the number and relative abundance of the species captured, so if light traps are used, the number of *S. minuta* captured is considerably lower (Gállego *et al.* 1992). However, the herpetophilic nature of this species means that it is of no importance in the epidemiology of leishmaniasis due



S. D. Barón and others

1240

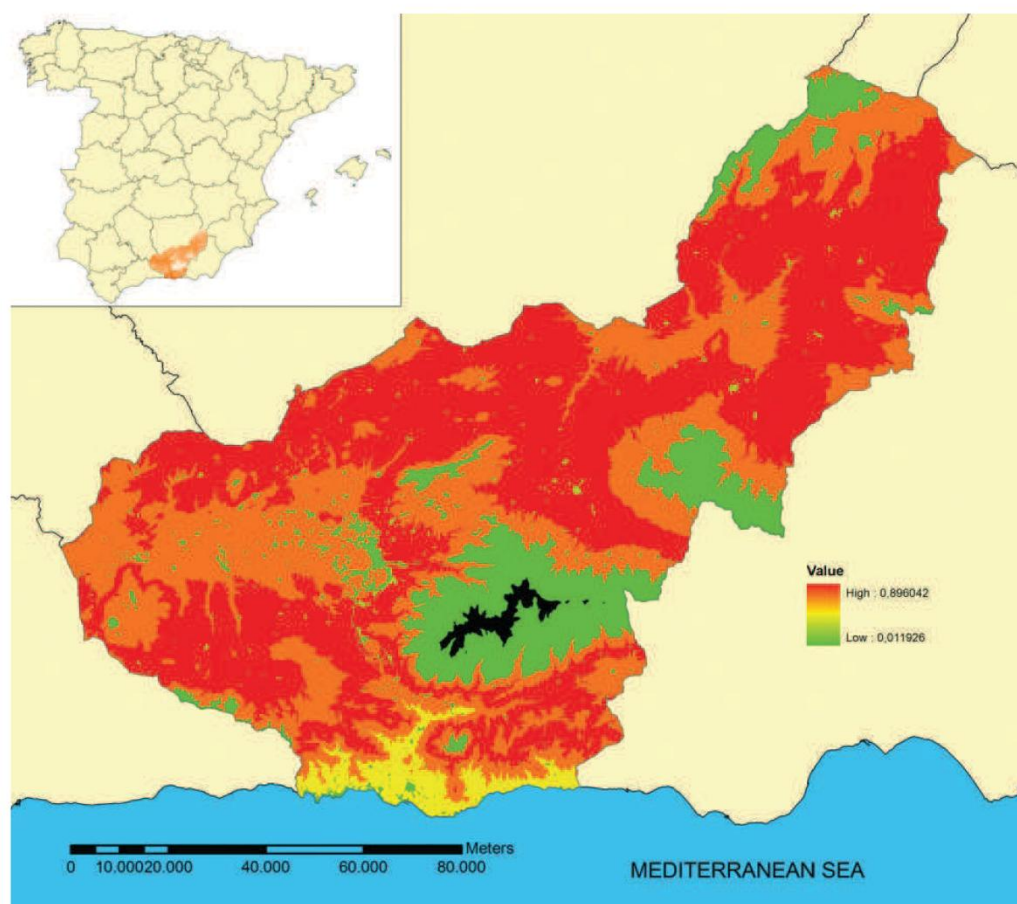


Fig. 2. Risk map for presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* according to altitude and land use (corine), without taking type of drainage hole into account. Black represents lack of data.

to *L. infantum*. We can confirm that *P. perniciosus* is dominant in its role as vector in comparison with *P. ariasi*, on showing higher figures in density, abundance and distribution (67·07% of sites sampled as opposed to 32·93% for *P. ariasi*), thus justifying the central role it plays in this study.

We obtained data for the presence and absence of *P. perniciosus* at 167 sampling sites distributed across the southern part of Granada province, from which we also took a series of ecological and climate-related data. Through logistic regression we estimated the probability of *P. perniciosus* presence at each sampling site as a function of these environmental variables. Although in the initial univariate analyses, the probability of *P. perniciosus* presence at a particular sampling site appeared to be associated with a large variety of factors, in the multivariate logistic regression model only altitude, land use and drainage hole features (with/without PVC piping) were retained as predictors for the distribution of this vector species. Among the variables which lose their

Table 4. Factors associated with the presence of *Phlebotomus perniciosus* in Granada province, southeast Spain

(This multivariate model was used to generate the maps in Figs 3 and 4. R square of Nagelkerke: 0·384.)

Variable	Trapping sites	Relative likelihood	P
Altitude	167	—	0·000
0–384	39	Ref	—
385–768 and 1154–1537	76	3·377	0·008
769–1153	41	7·782	0·001
1538–2691	11	0·120	0·060
Land use (Corine)	167	—	—
Other	150	Ref	—
Urban zone	17	0·139	0·004
Drainage hole features	167	—	—
PVC pipe	25	Ref	—
Other hole	142	5·652	0·002

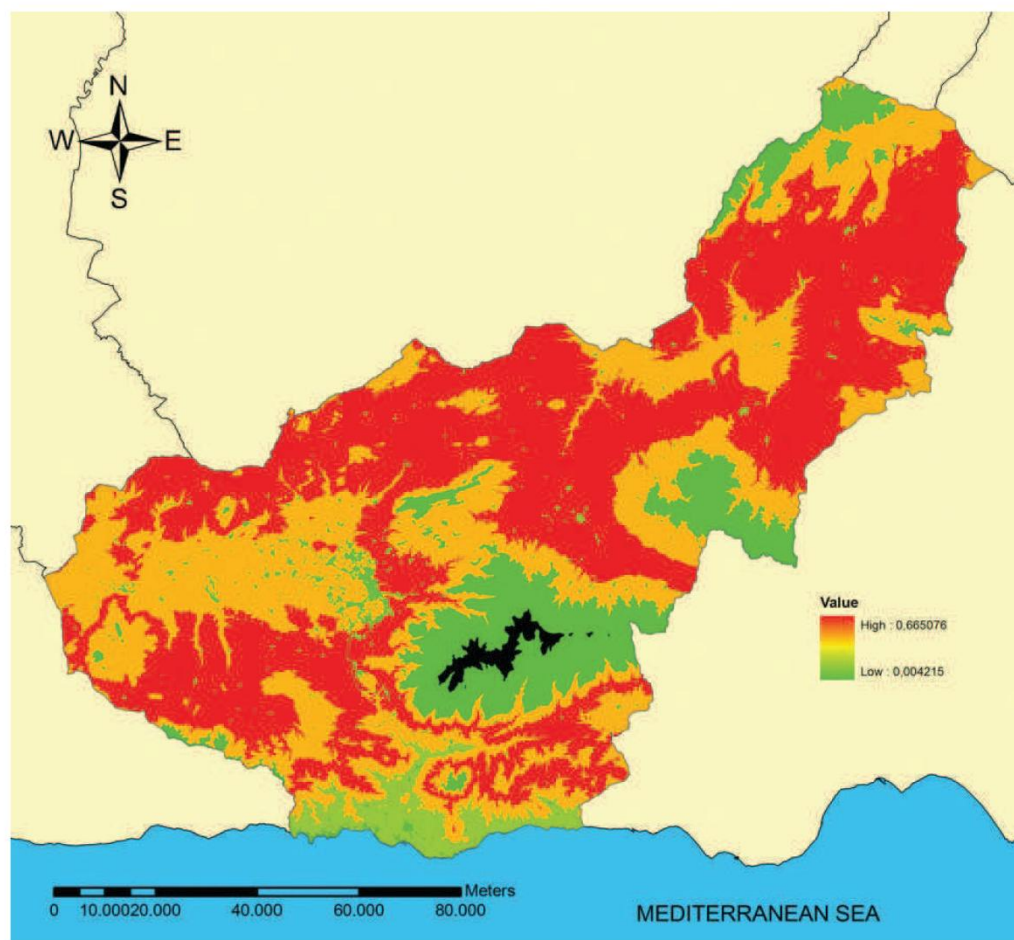


Fig. 3. Risk map in the hypothetical scenario that all retaining walls have PVC piping in their drainage holes. Black represents lack of data.

significance we have bioclimatic level, which is justifiable given that this variable comprises the influence of other factors such as altitude, relative humidity and vegetation (Rivas Martínez *et al.* 1987). The risk of *P. perniciosus* presence was found to be 2.4 times higher in the Mesomediterranean than in the Thermomediterranean, which is in accordance with the higher prevalence of canine leishmaniasis at this bioclimatic level (Martín-Sánchez *et al.* 2009). However, we must take into account that capture data may not be the same when annual sampling is carried out. Variation in altitude is one of the strongest determinants for variation in temperature and bears a heavy influence on rainfall, which would justify the loss of significance of the variable Land Surface Temperature (LST). In the univariate analysis, the range 23.7–25 °C shows a risk of *P. perniciosus* presence 4.2 times greater than at lower temperatures. Thomson *et al.* (1999) found that temperature,

alongside land type, is an important ecological determinant for the distribution of *P. orientalis* in Sudan. Land cover is partially determined by altitude and is closely correlated with other variables such as land use and main vegetation, which also showed association with *P. perniciosus* presence. We found that these dipterans prefer areas where there is some kind of scrub vegetation, especially if alongside olive groves and not located in the proximities of certain vegetation types – riverside, garden or deciduous trees together with chestnut trees. Areas with this type of vegetation tend to be wetter than those occupied only by scrub, and this humidity would not be well tolerated by this species which is typical of semi-arid areas (Rioux *et al.* 1997). In the sampling sites facing north and west there were fewer *P. perniciosus* present. Conversely, the presence of any animal near the sampling site increases the risk of encountering the vector by 89.6%, although not all

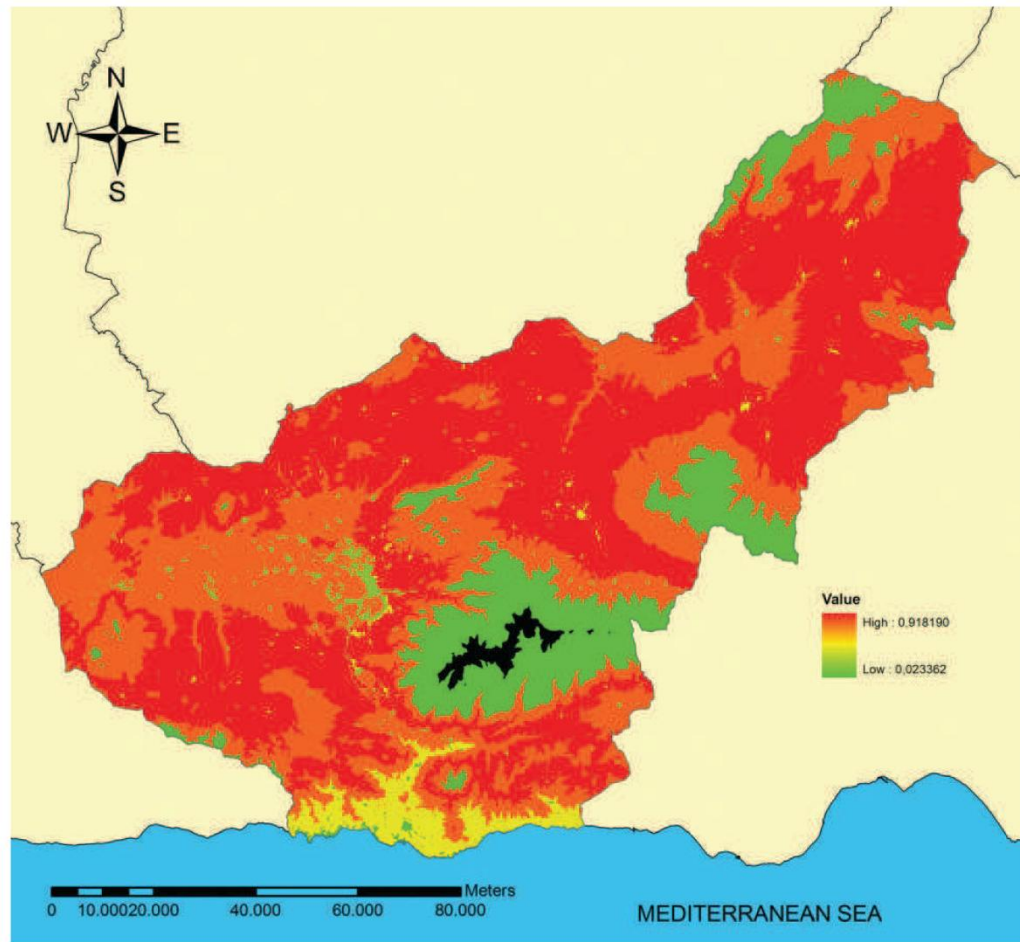


Fig. 4. Risk map in the hypothetical scenario in which none of the retaining walls have PVC piping in their drainage holes. Black represents lack of data.

animals have the same effect. Thus equines, sheep, cattle, goats and rabbits increase the probability of encountering this dipteran. Various authors have noted the preferences of *P. perniciosus* and *P. ariasi* for cattle (Rioux *et al.* 1986; De Colmenares *et al.* 1995; Rossi *et al.* 2008). The presence of dogs in the immediate vicinity of the sampling site turned out not to be statistically significant, just as happened in a study carried out in central Spain (Gálvez *et al.* 2010). The loss of significance of these and other variables in the multivariate model is a response to reasons which are difficult to determine.

It is common knowledge that the distribution of sandflies, including *P. perniciosus*, is heavily influenced by altitude (Guernaoui *et al.* 2006; Maroli *et al.* 2008). In this study, the altitudinal range that reveals the greatest presence of *P. perniciosus* is 769–1153 m, covering part of the Mesomediterranean and

Supramediterranean, which agrees along general lines with the data provided by Guevara-Benitez *et al.* (1978). The range in which one is least likely to encounter this vector species is 1538–2691 m, which corresponds to the Oromediterranean. Changes in land use will bring about alterations to the microhabitat surrounding the sampling sites, affecting sandfly populations, one of the most notable changes being the urbanization of land. The results indicate that *P. perniciosus* shows less affinity for these urban environments, the opposite phenomenon to that which occurs in the case of *P. papatasi* and *P. alexandri* in the Middle East (Colacicco-Mayhugh *et al.* 2010). Several studies have highlighted the influence of land use on the distribution of sandflies or other vectors (King *et al.* 2004; Cecchi *et al.* 2008; Claborn *et al.* 2008). One important limitation detected in the use of this variable, and which in general



can be extrapolated to other GIS variables, concerns the resolution of the data, which affects the classification of the land and determines the introduction of a significant bias. This limitation has also been pointed out by other authors (King *et al.* 2004; Cecchi *et al.* 2008). This can make it much more difficult to create risk maps to predict the behaviour of the event in wide areas. Another limiting factor, also pointed out by other authors, is the difficulty of including variables in the study which do not represent spatial data but which are nevertheless of great epidemiological interest (Cecchi *et al.* 2008; King *et al.* 2004). This is the case with the presence/absence of PVC piping in drainage holes, which is presented in this study as a feasible control measure against *P. perniciosus*, the dominant *L. infantum* vector in the area. The walls which have PVC in their drainage holes are generally more recently built than the typical terrain retaining walls, and they generally retain less soil. Also, fewer animals are found inside (reptiles, micromammals, arthropods, etc...). The absence of these animals not only limits potential food sources for adult females, but also reduces the presence of organic matter produced by the waste of these animals. This, together with the scarce soil retention which makes it impossible for plants to grow, means that the holes containing PVC offer unfavourable conditions for the proliferation of sandfly larvae, which need this organic matter in order to develop. All in all, this makes these holes less apt for sandfly resting and breeding sites. It has been demonstrated how the drainage hole features produce significant variations in the probability of *P. perniciosus* presence, oscillating from 2·3 to 91·8% if PVC piping is absent and from 0·4 to 66·5% if all holes have PVC piping. Altitude and land use being equal, the use of PVC piping in the construction of drainage systems for walls would reduce the probability of encountering *P. perniciosus* in them by up to 25·3%, thus demonstrating its potential usefulness as a protection factor against the presence of this vector and therefore against leishmaniasis. As already pointed out, there is a positive linear association between the risk of *P. perniciosus* presence and the seroprevalence of canine leishmaniasis, although according to the model, the variability in the risk only explains 27·2% of the variability in the prevalence. Among the other factors involved, the age and weight of the animal, its activity and its location at night have been pinpointed (Martín-Sánchez *et al.* 2009).

The control of sandflies is perceived as a measure to reduce the transmission of *L. infantum* which is more efficient and more readily accepted by society than that of putting down infected dogs (Alexander and Maroli, 2003). Among the methods employed, the use of insecticides plays an important role, both in houses, animal shelters and surrounding vegetation and in common sandfly resting and feeding places. However, for environmental reasons its prolonged

use would not be allowed. It is precisely in this aspect where measures such as the use of PVC piping begin to acquire importance, because it is a simple non-toxic way to significantly reduce the presence of *P. perniciosus*. Given that this type of retaining wall may be located near inhabited areas or passing places, it would be an effective control method which, in conjunction with other methods, could help to reduce the transmission of this disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the E.U. for EDEN (GOCE-2003-010284-2).

FINANCIAL SUPPORT

Regional Government of Andalusia [Junta de Andalucía] subsidize the group CIV-176; the Spanish Ministry of Education and Science [Ministerio de Educación y Ciencia] the projects AGL2004-06909-CO2-O2/GAN and CGL2007-66943-CO2-O2/BOS; EDEN provided S.D.B. with a Ph.D. Student grant.

REFERENCES

- Acedo-Sánchez, C., Martín-Sánchez, J., Vélez-Bernal, I.D., Sanchis-Marín, M.C., Louassini, M., Maldonado, J.A. and Morillas-Márquez, F. (1996). Leishmaniasis Eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, southern Spain). *International Journal for Parasitology* 25, 303–10.
- Alexander, B. and Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 1–18.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J. and Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 57, 1–88.
- Cecchi, G., Mattioli, R.C., Slingenbergh, J. and de la Rocque, S. (2008). Land cover and tsetse fly distributions in sub-Saharan Africa. *Medical and Veterinary Entomology* 22, 364–73. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00747.x
- Chamaillé, L., Tran, A., Meunier, A., Bourdoiseau, G., Ready, P. and Dedet, J.P. (2010). Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasites & Vectors* 3, 31. doi: 10.1186/1756-3305-3-31.
- Claborn, D., Masuoka, P., Morrow, M. and Keep, L. (2008). Habitat analysis of North American sandflies near veterans returning from leishmania-endemic war zones. *International Journal of Health Geographics* 7, 65. doi: 10.1186/1476-072X-7-65
- Colacicco-Mayhugh, M.G., Masuoka, P.M. and Grieco, J.P. (2010). Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Middle East. *International Journal of Health Geographics* 9, 2. doi: 10.1186/1476-072X-9-2
- Conesa Gallego, E., Romera Lozano, E. and Martínez Ortega, E. (1999). Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la comunidad de Madrid (España). *Anales de Biología* 22, 43–50.
- De Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M. and Seguí, G. (1995). Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *Journal of Medical Entomology* 32, 229–233.
- Eisen, L. and Lozano-Fuentes, S. (2009). Use of mapping and spatial and space-time modeling approaches in operational control of *Aedes aegypti* and Dengue. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 3, e411. doi: 10.1371/journal.pntd.0000411
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gallego, J. and Portús, M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of Priorat focus. *Veterinary Parasitology* 83, 87–97.
- Gállego Berenguer, J., Botet Fregola, J., Gállego Culleré, M., Portús, M. and Vinyeta, M. (1992). Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre métodos de captura. "In memoriam" al Prof. D. F. de P. Martínez Gómez. 581–600.



- Gálvez, R., Descalzo, M. A., Miró, G., Jiménez, M., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I. and Molina, R. (2010). Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Tropica* **115**, 95–102.
- Gil Collado, J., Morillas Márquez, F. and Sanchis Marin, M. C. (1989). Los flebotomos en España. *Revista de Sanidad e Higiene Publica* **68**, 15–34.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A. and Laamrani, A. (2006). Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta Tropica* **97**, 346–351.
- Guevara-Benitez, D., Ubeda-Ontiveros, J. M. and Morillas-Marquez, F. (1978). *Phlebotominae* de la provincia de Granada: estudio de poblaciones. *Revista Ibérica de Parasitología* **38**, 813–839.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology* **4**, 1–24.
- King, R. J., Campbell-Lendrum, D. H. and Davies, C. R. (2004). Predicting geographic variation in cutaneous leishmaniasis, Colombia. *Emerging Infectious Diseases* **10**, 598–607.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M. and Gradoni, L. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine & International Health* **13**, 256–264.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. and Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology* **145**, 267–273.
- Martín-Sánchez, J., Guilvard, E., Acedo-Sánchez, C., Wolf-Echiverri, M., Sanchis-Marin, M. C. and Morillas-Márquez, F. (1994). *Phlebotomus perniciosus* Newstead 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (Southern Spain). *International Journal for Parasitology* **24**, 405–408.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V. and Morillas-Márquez, F. (2009). Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases* **15**, 795–798.
- Morillas-Márquez, F., Benavides Delgado, I., Gozález Castro, J., Reyes Magaña, A. and Valero López, A. (1985). Découverte de *Leishmania* sp. dans les *Rattus rattus* de la province de Grenade (Espagne). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **60**, 768–770.
- Morillas-Márquez, F., Guevara Benitez, D. C., Ubeda Ontiveros, J. M. and González Castro, J. (1983). Fluctuations annuelles des populations de phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **58**, 625–632.
- Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., Díaz-Sáez, V., Barón-López, S., Morales-Yuste, M., Alves de Lima Franco, F. and Sanchis-Marin, M. C. (2010). Climate change and infectious diseases in Europe: leishmaniosis and its vectors in Spain. *The Lancet* **10**, 216–217.
- Muñoz Hoyos, A., Morillas Marquez, F., Duque Alcuña, G., Bayes Garcia, R., Rivas Moreno, F. J., Loscertales Abril and Girón Caro, F. (1983). Epidemiologic aspects of visceral leishmaniosis in the Province of Granada. *Anales Españoles de Pediatría* **18**, 189–95.
- Pesson, B., Ready, J. S., Benabdenbi, I., Martín-Sánchez, J., Essegir, S., Cadi-Soussi, M., Morillas-Márquez, F. and Ready, P. D. (2004). Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Medical and Veterinary Entomology* **18**, 25–37.
- Rioux, J. A., Akalay, O., Preireires, J., Dereure, J., Mahjour, J., Le Houerou, H. N., Leger, N., Desjeux, P., Gállego, M., Saddiki, A., Barkia, A. and Nachi, H. (1997). L'évaluation écoépidémiologique du «risque leishmanien» au Sahara atlantique marocain. Intérêt heuristique de la relation «Phlébotomes-bioclimats». *Ecologia Mediterránea* **23**, 73–92.
- Rioux, J. A., Guilvard, E., Gállego, J., Moreno, G., Pratlong, F., Portús, M., Rispaill, P., Gállego, M. and Bastien, P. (1986). *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer. *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques* (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984) IMEEE. 439–444.
- Rispaill, P., Dereure, J. and Jarry, D. (2002). Risk zones of human leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. Correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 477–483.
- Rivas Martínez, S., Bandullo, J. M., Serrada, R., Allue Andrade, J. L., Moreno del Burgo, J. L. and González Rebollar, J. L. (1987). *Memoria del Mapa de series de vegetación de España* (Edit. ICONA). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L. and Maroli, M. (2008). Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Tropica* **105**, 158–165.
- Semenza, J. C. and Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet Infectious Diseases* **9**, 365–375.
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M. C., Triscioglio, A. and Cortazar, C. (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* **155**, 198–203.
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Serra, P., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D. and Ferrer, L. (2003). Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Veterinary Journal* **35**, 320–323.
- Srivastava, A., Nagpal, B. N., Joshi, P. L., Paliwal, J. C. and Dash, A. P. (2009). Identification of malaria hot spots for focused intervention in tribal state of India: a GIS based approach. *International Journal of Health Geographics* **8**, 30. doi: 10.1186/1476-072X-8-30
- Thomson, M. C., Elnaïem, D. A., Ashford, R. W. and Connor, S. J. (1999). Towards a kala azar risk map for Sudan: mapping the potential distribution of *Phlebotomus orientalis* using digital data of environmental variables. *Tropical Medicine & International Health* **4**, 105–113.
- Modelo Digital del Terreno de Andalucía: Relieve y Orografía (http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/web/menuitem.a5664a21473c3df81d8899661525ea0/?vgnnextoid=0849f1ca90891110VgnVCM1000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=3259b19c7acf2010VgnVCM1000001625e50aRCRD&lr=lang_es)
- Usos y Coberturas Vegetales del Suelo de Andalucía ('corine') (http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/web/menuitem.d57ba3a565d2db10e849d04650525ea0/?vgnnextoid=0ad67e3e2cd0110VgnVCM1000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=8bf5e1d14ab74210VgnVCM1000001325e50aRCRD&vgnnextfmt=rediam&lr=lang_es)





3.4. Artículo 4: Predicting the risk of an endemic focus of *Leishmania tropica* becoming established in south-western Europe through the presence of its main vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917.

Prediciendo el riesgo de que un foco endémico de *Leishmania tropica* se establezca en el suroeste de Europa a través de la presencia de su principal vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917.

Barón S.D., Morillas-Márquez F., Morales-Yuste M., Díaz-Sáez V., Gállego M., Molina R., Martín-Sánchez J.

Parasitology (2013); 140(11): 1413-21.

Factor de Impacto: Año de publicación - 2'355 2º cuartil (14/35 en Parasitology).

Actual – 2'355 2º cuartil (14/35 en Parasitology).

Resumen: Nuestro objetivo ha sido la construcción de mapas de riesgo de exposición a *Phlebotomus sergenti*, el principal vector de *Leishmania tropica*, con el fin de identificar los puntos calientes para el posible establecimiento de este parásito en el suroeste de Europa. Se recogieron datos sobre la presencia/ausencia de este vector y las características ecológicas y climáticas de 662 sitios de muestreo localizados en el sudeste, centro y noreste de la Península Ibérica (suroeste de Europa). Se determinaron los factores ambientales asociados con la distribución de *P. sergenti*. Los mejores predictores de la presencia de este díptero fueron 'altitud', 'uso del terreno', 'temperatura de la superficie terrestre', 'orientación', 'cobertura del terreno adyacente', 'ausencia de vegetación en el muro' y 'ausencia de tubos de PVC en los agujeros de drenaje de los muros de contención'. Los mapas de riesgo de exposición al vector se



elaboraron sobre la base de estas variables. La validación del modelo de riesgo predictivo confirmó su utilidad en la detección de zonas con un alto riesgo de presencia de *P. sergenti*. Estos lugares representan posibles puntos calientes para el establecimiento de un foco autóctono de *L. tropica*. En conclusión, los mapas de riesgo de presencia de *P. sergenti* producidos revelaron que varias áreas en el centro y sur de la Península Ibérica son las más propensas a este proceso, lo que haría posible que la enfermedad entre en el suroeste de Europa.



Predicting the risk of an endemic focus of *Leishmania tropica* becoming established in south-western Europe through the presence of its main vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917

S. D. BARÓN¹, F. MORILLAS-MÁRQUEZ¹, M. MORALES-YUSTE¹, V. DÍAZ-SÁEZ¹, M. GÁLLEGO², R. MOLINA³ and J. MARTÍN-SÁNCHEZ^{1*}

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus Universitario de Cartuja, 18071 Granada, Spain

² Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo S/N, 28220, Majadahonda, Madrid, Spain

(Received 29 January 2013; revised 23 March and 22 April 2013; accepted 11 May 2013)

SUMMARY

The aim of the study was the construction of risk maps for exposure to *Phlebotomus sergenti*, the main vector of *Leishmania tropica*, with a view to identifying hot spots for the potential establishment of this parasite in the southwest of Europe. Data were collected on the presence/absence of this vector and the ecological and climatic characteristics of 662 sampling sites located in the southeast, centre and northeast of the Iberian Peninsula (south-western Europe). The environmental factors associated with the distribution of *P. sergenti* were determined. The best predictors for the presence of this dipteran were 'altitude', 'land use', 'land surface temperature', 'aspect', 'adjacent land cover', 'absence of vegetation in wall' and the 'absence of PVC pipes in the drainage holes of retaining walls'. Risk maps for exposure to the vector were drawn up based on these variables. The validation of the predictive risk model confirmed its usefulness in the detection of areas with a high risk of *P. sergenti* being present. These locations represent potential hot spots for an autochthonous focus of *L. tropica* becoming established. The risk maps produced for *P. sergenti* presence revealed several areas in the centre and south of the Iberian Peninsula to be the most prone to this process, which would make it possible for the disease to enter south-western Europe.

Key words: anthroponotic cutaneous leishmaniasis, *Leishmania tropica*, predictive distribution of *Phlebotomus sergenti*, Geographic Information Systems (GIS), environmental factors, risk maps, south-western Europe.

INTRODUCTION

Species of the *Leishmania* genus (*Kinetoplastida*, *Trypanosomatidae*) are transmitted by nematoceran Diptera of the *Phlebotomidae* family, of the *Phlebotomus* genus in the Old World and the *Lutzomyia* genus in the New World, with a certain specificity existing between the species of *Leishmania* and the subgenus of sandflies which transmit it (Ready, 2011). Recently, the possible involvement of the *Sergentomyia* genus has been suggested in the transmission of *Leishmania infantum* in Senegal and *L. major* in Mali (Senghor *et al.* 2011; Berdjane-Brouk *et al.* 2012). *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 is the main vector of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* Wright, 1903, based on its distribution and on the fact that *L. tropica* has been identified in infected sandflies recovered from endemic foci (Al-Zahrani *et al.* 1988; Guilvard *et al.* 1991; Schnur *et al.* 2004). Kamhawi *et al.* (2000) confirm that *P. sergenti*

supports the full development of *L. tropica*, and reveal that the vector is refractory to other Old World *Leishmania* species. Recent ACL outbreaks caused by *L. tropica* were reported across a wide area from North Africa to the Middle East, including Turkey and Central Asia (Schnur *et al.* 2004; Svobodova *et al.* 2006; Kimutai *et al.* 2009). In Morocco, this disease is endemic in semi-arid areas in the centre and south of the country and is emerging with epidemic foci in the north. Currently *L. tropica* is thought to be the species with the widest geographical distribution in Morocco (Guessous-Idrissi *et al.* 1997). Here this species, despite being considered responsible for ACL and thus having no need for an animal reservoir in its life cycle, has also been isolated in dogs (Dereure *et al.* 1991).

Phlebotomus sergenti has a wider geographical distribution than the parasite which it transmits, *L. tropica* (Depaquit *et al.* 2002). In south-western Europe, it is commonly found in the centre and south of the Iberian Peninsula, whilst in the north it has only been cited in Catalonia, Zaragoza and La Rioja (Gállego Berenguer *et al.* 1992; Depaquit *et al.* 2002; Aransay *et al.* 2004). It has also been captured in the south of France (Rioux *et al.* 1982), as well as on

* Corresponding author: Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus Universitario de Cartuja, 18071 Granada, Spain. E-mail: joaquina@ugr.es



the islands of Corsica (Rioux *et al.* 1970) and Sicily (D'Urso *et al.* 2004).

In south-western Europe, *L. infantum* is the only species responsible for leishmaniasis—both cutaneous and visceral—in humans, dogs and other hosts (Martín-Sánchez *et al.* 2004; Pratlong *et al.* 2004; Campino *et al.* 2006). Its proven vectors in this region are species of the subgenus *Larroussius*, *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi*, which can act in one same focus in sympatric conditions (Guilvard *et al.* 1996). Although in south-western Europe no autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis caused by *L. tropica* have been detected, the south of the Iberian Peninsula is an area which is susceptible to the introduction of this protozoa due to its proximity to northern Morocco (an emerging ACL area), the migratory flow of people between the two territories and the presence of its main vector. This could constitute the first step in its potential spread across other susceptible areas of south-western Europe. Gramiccia and Gradoni (2005) describe a similar scenario for southern Italy (Sicily) and suggest the importation of infected dogs from North Africa as another possible entry route for the parasite into Italy.

Geographical Information Systems (GIS) allow us to collect, store, manage, visualize and analyse geographically referenced data for the purposes of supporting the decision-making process when addressing problems occurring in a given geographical space, for which reason they have come to be considered an excellent tool for use in the epidemiology of vector-borne diseases (Srivastava *et al.* 2009). These studies highlight the importance of climatic and environmental factors in the distribution of different vectors and of the diseases they transmit. The use of GIS makes it possible to integrate epidemiological and environmental data and allows us to generate predictive maps, which are a more expressive and visual medium for identifying the risk factors associated with the disease and thus also the possible consequent control measures to be taken (Semenza and Menne, 2009).

By this method, we aimed to determine the environmental factors associated with the distribution of *P. sergenti*, with a view to constructing risk maps for exposure to the vector which could help to identify the hot spots for the potential establishment of *L. tropica* in the southwest of Europe.

MATERIALS AND METHODS

Study areas

Three different sampling areas located in the south-east, centre and northeast of the Iberian Peninsula were selected. The orographic and climatic characteristics of these areas allow diverse bioclimatic levels to exist, each with different environmental

and vegetation features: Thermo-mediterranean, Meso-mediterranean, Supra-mediterranean, Oro-mediterranean and Crio-mediterranean (Rivas Martínez *et al.* 1987). Several of these bioclimatic levels are present in all areas under study. The data obtained in the southeast of the Iberian Peninsula were used in the construction of the risk model, while data from the central (Gálvez *et al.* 2010) and north-eastern areas were used for the validation of the model produced. The southeast of the Peninsula was chosen to generate the risk model based on its greater bioclimatic resemblance to northern Morocco (Martínez-Ortega, 1988), an emerging ACL area, as well as on the greater richness of *P. sergenti* in this area of the Iberian Peninsula (Guevara-Benítez *et al.* 1978; Morillas-Márquez *et al.* 1983).

Capture and morphological identification of sandflies

This study was carried out in the years 2004, 2006 and 2007. The capture method chosen was sticky traps (paper impregnated with castor oil). The traps were placed in the drainage holes of retaining walls for roads and houses (spots where sandflies tend to rest), and were kept there for 4 days. Early July was chosen as the capture date due to criteria regarding maximum species richness (Morillas-Márquez *et al.* 1983) and because it is within the high density period in the phenology of *P. sergenti* (Martínez-Ortega, 1986). Six hundred and sixty-two sampling sites were investigated, of which 167 were in the southeast, 155 in the centre and 340 in the northeast of the Iberian Peninsula (Fig. 1).

The specimens captured were cleared in Marc André solution and then mounted under a cover slip in Berlese's medium. Species classification was conducted via inspection of their main morphological characteristics under an optical microscope (Gállego Berenguer *et al.* 1992).

Variables studied

The ecological and climatic characteristics of each of the 662 sampling sites were collected by two different methods: environmental data obtained via GIS, and notes taken *in situ* using a PDA (Personal Digital Assistant). All these characteristics were used as independent variables set against the presence/absence of *P. sergenti* as the dependent variable. Multivariate logistic regression was the statistical technique of choice to estimate the probability of occurrence of the event, since the dependent variable can only have a value of 0 (absence) or 1 (presence).

Environmental data obtained via GIS were: altitude (Digital Terrain Model), land use (CORINE), slope, aspect, 'Normalized Difference Vegetation Index' (NDVI) and annual average land surface temperature (aaLST). Data collected via

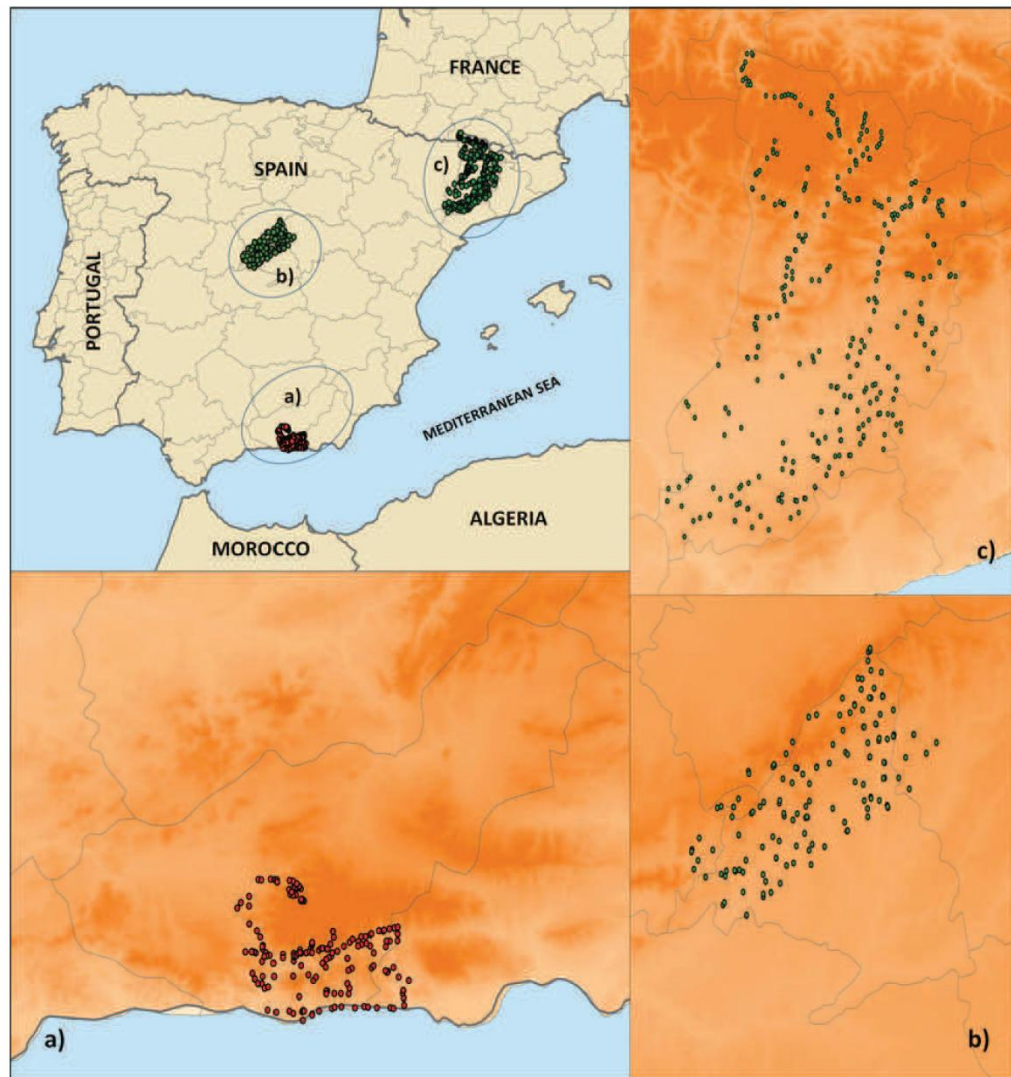


Fig. 1. Location of sampling sites. (a) Sampling sites in the southeast which were used to construct the statistical model; (b) Sampling sites in the centre; (c) Sampling sites in the northeast; b and c were used for the validation of the statistical model.

PDA were: Location of sampling site (geographical coordinates), number of traps laid and collected, meteorological data (rain, wind), ecological and environmental factors (site relative to settlement, situation of site, site category, aspect, shelter, water course, retaining wall construction, drainage hole construction, hole interior, wetness of holes, vegetation in wall, well present, refuse bin present), bioclimatic level, predominant natural vegetation adjacent zone 0–100 m, predominant natural vegetation nearby zone 100–1000 m, second predominant natural vegetation nearby zone 100–1000 m; predominant adjacent land cover, second predominant

adjacent land cover; presence of different animals in the immediate vicinity. In order to collect these variables with a PDA, a database was used designed by the leishmaniasis group EDEN-LEI from the EDEN project (Emerging diseases in a changing European environment, GOCE-2003-010284), thus standardizing the collection of field data.

Spatial statistical analyses and maps

Using data from the southeast of the Iberian Peninsula, univariate logistic regression studies were conducted using the SPSS 15.0 software for



Table 1. Number of specimens captured, abundance and density of *P. sergenti* in the southeast of the Iberian Peninsula, the area on which we focused for the construction of the statistical model

Bioclimatic level	Ps	Other sp.	Total	% Ps	Dens. Ps
Thermo-mediterranean	125	13 906	14 031	0.891	1.818
Meso-mediterranean	143	14 056	14 199	1.007	1.645
Supra-mediterranean	8	1771	1779	0.450	0.267
Oro-mediterranean	0	10	10	0.000	0.000
Total	276	29 743	30 019	0.919	1.353

Ps: *Phlebotomus sergenti*; other sp.: other sandfly species captured, including *Sergentomyia minuta*; Dens. Ps: Density of *Phlebotomus sergenti* (no. *Phlebotomus sergenti*/m²).

Windows, with all the independent variables set against the presence/absence of *P. sergenti* as the dependent variable. In the search for association with the dependent variable, the continuous variables were categorized and the categorical ones were recategorized. Different univariate logistic regression models were constructed and compared in order to detect cases of collinearity, interaction and confusion between the independent variables. For cases in which there was a strong correlation between variables, the one with the greatest significance or the one which was easiest to represent on a map was retained. All variables returning a value of $P \leq 0.2$ in the univariate study were used to construct the multivariate model.

In the final multivariate model variables with $P \leq 0.1$ were retained. Based on this statistical model, risk maps for exposure to *P. sergenti* were generated using the program ArcGis 9.2. In this way we were able to extrapolate specific data into wider geographical areas, which in this case constitute the south-western area of Europe, encompassing Spain, Portugal and the south of France.

Validation of the statistical model

Validation of the above predictive risk model was carried out using the capture data from the centre and northeast of the Iberian Peninsula. Through logistic regression using SPSS 15.0 for Windows, the *P. sergenti* presence/absence data obtained in the 495 sampling sites in the centre and northeast of Iberian Peninsula (dependent variable) were compared with the 'theoretical risk' values taken from those same points on the map which was generated (independent variable). Parallel to this, the Spearman Test (SPSS 15.0 for Windows) was used in order to determine whether or not there was correlation between the 'real risk' of *P. sergenti* presence, expressed in terms of the percentage of positive sites, and the 'theoretical risk' obtained from the risk model produced.

RESULTS

Capture data and species identification

In the southeast of the Iberian Peninsula, 30 019 sandflies were collected from the 1633 traps

recovered (loss of 3.6%), with a resulting total capture density of 147.06 sandflies/m² of sticky trap (st). Six different species were identified belonging to two genera: *Sergentomyia* (*Sergentomyia minuta*) and *Phlebotomus* (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. sergenti* and *P. alexandri*). Two hundred and seventy-six specimens (227♂ + 49♀) were classified morphologically as *P. sergenti*. The total density of *P. sergenti* was 1.35 sandflies/m² st and it was present in 24.6% of the sites sampled (41/167). At the Thermo-mediterranean and Meso-mediterranean levels similar density and abundance values for *P. sergenti* were recorded, whilst in the Supra-mediterranean both values are considerably lower. In the Oro-mediterranean no vector species were captured, since the 10 specimens found were identified as *S. minuta* (Table 1).

In the centre of the Iberian Peninsula, 85 specimens of *P. sergenti* were captured, with a total density of 0.66 sandflies/m² st and a presence in 12.9% of the sites sampled (20/155), whilst in the northeast, 65 *P. sergenti* specimens were found, registering a total density of 0.20 sandflies/m² st and a presence in 4.7% of the sites (16/340). *Phlebotomus sergenti* was captured at altitudes ranging from 76 to 1353 m above sea level.

Statistical study and construction of predictive model

Once the univariate logistic regression models had been constructed and analysed, we were able to confirm that 12 of the independent variables display association with the presence/absence of *P. sergenti* (dependent variable) with a $P \leq 0.2$: 'bioclimatic level', 'elevation', 'land use' (CORINE), 'aaLST', 'aspect', 'equines', 'pets', 'domestic birds', 'all animals', 'drainage hole construction', 'land cover' and 'vegetation in wall'.

Finally, the variables which make up the multivariate logistic regression model and that are shown to be the best predictors for the presence/absence of *P. sergenti* are 'altitude' (a. 0–1153 m, b. 1154–2091 m), 'land use' (a. other uses, b. rivers and natural water courses), 'aaLST' (a. other temperatures, b. 23.3–26.8 °C), 'aspect' (a. 160–359°, b. 1–159°), 'adjacent land cover' (a. other uses, b. almond and



Table 2. Variables associated with *Phlebotomus sergenti* presence: (a) From multivariate model obtained via logistic regression including PDA and GIS variables which show association with the dependent variable (presence/absence of *P. sergenti*); this model was used to generate the risk maps in Fig. 3b and c (Nagelkerke *R*-square: 0.368); (b) From multivariate model in which PDA variables were excluded due to not being representable in graphic terms on a map; this model was used to generate the risk map in Fig. 2 (Nagelkerke *R*-square: 0.227)

Variable	Trapping sites	a		b	
		Relative likelihood	<i>P</i>	Relative likelihood	<i>P</i>
Altitude	167	—	—	—	—
1154–2691	35	Ref	—	Ref	—
0–1153	132	3.463	0.067	3.132	0.063
Aspect	167	—	—	—	—
160–359	99	Ref	—	Ref	—
0–159	68	3.135	0.009	2.934	0.007
Land surface temperature (LST)	167	—	—	—	—
Rest of temperatures	43	Ref	—	Ref	—
23.3–26.8 °C	124	7.870	0.009	7.334	0.009
Land use (Corine)	167	—	—	—	—
Other	161	Ref	—	Ref	—
River and natural course	6	8.736	0.031	4.140	0.108
Vegetation in wall	167	—	—	—	—
Yes	41	Ref	—	Not included	—
No	126	4.203	0.013	—	—
Adjacent land cover	167	—	—	—	—
Rest of land cover types	122	Ref	—	Not included	—
Citrus and almond trees	45	3.113	0.010	—	—
Drain hole construction	167	—	—	—	—
PVC pipe	25	Ref	—	Not included	—
Other hole	142	5.854	0.032	—	—



Fig. 2. Risk map of statistical model without PDA variables (set out in Table 2b). Risk values: 1.3–78.0%.

citrus trees), 'presence/absence of vegetation in wall' and 'presence/absence of PVC pipes in the drainage holes of retaining walls'. The variables 'adjacent land cover', 'vegetation in wall' and 'PVC pipes' are collected via PDA and represent characteristics pertaining to the trapping sites for which GIS layers

are not available, thus in order to be represented they had to be included in the constant of the statistical model (Table 2a). Using only the variables obtained via GIS ('altitude', 'aspect', 'aaLST' and 'land use') a new statistical model was developed (Table 2b), since only these can be represented on a map.

With this second statistical model a first risk map was generated, returning risk values of *P. sergenti* presence ranging from 1.3 to 78.0% (Fig. 2). Subsequently, the possibility of including the 3 PDA variables in the constant of the mathematical model set out in Table 2a permitted the generation of 8 different risk models (Fig. 3a) and their corresponding risk maps. Thus we find that, with all other variables being equal, the probability of encountering *P. sergenti* in Spain varies from 0.04 to 25.1% in the most restrictive risk map (Fig. 3c) (all retaining walls without almond or citrus trees nearby, with vegetation in wall and with PVC in drainage holes), while in the highest risk model (all retaining walls with almond or citrus trees nearby, without vegetation and without PVC) it varies from 3.3 to 96.3% (Fig. 3b), which constitutes a considerably increased risk of encountering this sandfly. The remaining possibilities and the variations in risk produced are presented in Fig. 3a.

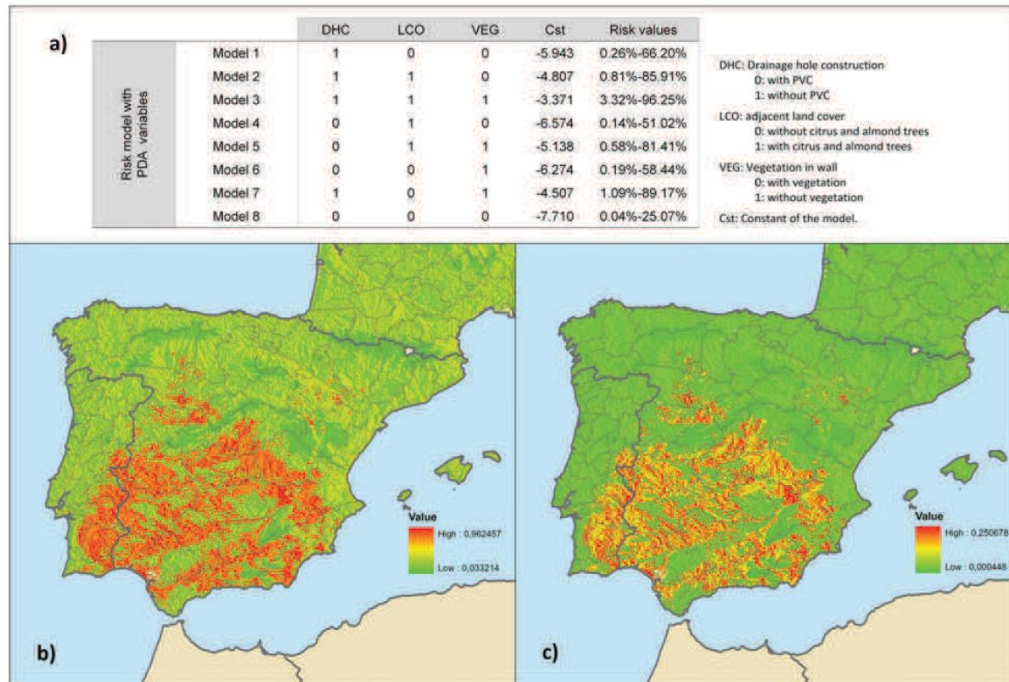


Fig. 3. Statistical model with PDA variables: (a) Modification of risk values according to the PDA variables (not representable on the map) – all possible combinations for the three categorical PDA variables are shown; (b) Risk map of model 3 in the table; (c) Risk map of model 8 in the table.

Table 3. Validation of the risk model without PDA variables: levels and values of theoretical risk (taken from map in Fig. 2) and real risk (percentage of positive sites relative to total number of sites at each level) in the five risk levels obtained in trapping sites in the centre and northeast of the Iberian Peninsula

Theoretical risk level	Theoretical risk (%)	Trap sites	Trap sites +	Real risk (%)
1a	1.257	81	0	0.000
1b	3.717	272	21	7.721
1c	10.471	97	4	4.124
2	22.636	32	6	18.750
3	46.182	13	5	38.462

Validation of the statistical model

The risk model produced with data from the south-east of the Iberian Peninsula which does not include variables collected by PDA (Fig. 2) indicates that the probability of capturing *P. sergenti* in the centre and northeast of the Iberian Peninsula can be divided into five different risk levels (Table 3), which allows us to determine what we refer to as the 'theoretical risk'. Reducing this to three risk levels – 1 (1a, 1b, 1c)

(<11%), 2 (22.6%) and 3 (46.2%) (Table 3) – allowed us to confirm that finding *P. sergenti* in areas with 'theoretical risk' level 2 was 4.08 times more likely than in those with risk levels below 11% (level 1) ($P = 0.005$), while in level 3 areas the risk of *P. sergenti* being present is 10.63 times greater ($P < 0.001$) than in level 1 areas. Correlation between the 'theoretical risk' and the 'real risk', the latter determined on the basis of capture data, is 90% ($P = 0.037$).

DISCUSSION

Although to date no cases of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *L. tropica* have been diagnosed in south-western Europe, the presence of its main vector, *P. sergenti*, has been widely demonstrated (Morillas-Márquez *et al.* 1983; Gállego Berenguer *et al.* 1992; Semião-Santos *et al.* 1995; Depaquit *et al.* 2002; Aransay *et al.* 2004). In the southeast of the Iberian Peninsula this species has an average density of 1.35 sandflies/m² st and was found in 24.6% of the sampling sites. The total abundance of *P. sergenti* was 0.9%, although this figure is an underestimate due to the choice of capture method, sticky traps, in which there is a considerable



increase in *S. minuta* captures (Gállego Berenguer *et al.* 1992). If we take into account only specimens belonging to the *Phlebotomus* genus, the abundance rises to 9.1%. It was noted that in certain sites these low density and/or abundance values rise significantly, reaching figures of 35.27 *P. sergenti*/m² st and representing up to 75% of total captures. In emerging Moroccan foci of *L. tropica*, the density of *P. sergenti* varies from 4 to 16 specimens/m² st (Ramaoui *et al.* 2008), and Rioux *et al.* (1986) reported a density of 1.79 *P. sergenti*/m² st in typical foci of ACL caused by *L. tropica* located in arid areas of Tunisia. Furthermore, in previous studies it was mentioned that *P. perniciosus* density values of ≥ 4 sandflies/m² st increase the risk of *L. infantum* transmission in dogs (Martín-Sánchez *et al.* 2009), and that in areas where *P. ariasi* density is ≥ 5 sandflies/m² st cases of canine leishmaniasis appear (Rioux *et al.* 1977). In spite of the fact that the dynamics of transmission can be very different, as an approximation we can assume that the above data related to *L. infantum* can be extrapolated to the pair *P. sergenti*/*L. tropica*. This would mean that in the Iberian Peninsula there are areas in which *P. sergenti* density is sufficient for these sandflies to be able to act as vectors. Moreover, some studies highlight the bioclimatic affinity between northern Morocco and the southeast of the Iberian Peninsula, along with the high concordance of sandfly species found at each bioclimatic level (Martínez Ortega, 1988). This similarity between the north of Morocco (an emerging ACL zone) and the southeast of the Peninsula, and the *P. sergenti* density values detected, indicate that this area of south-western Europe may be susceptible to the introduction of *L. tropica*, in a similar way to what has occurred in northern Morocco (Guessous-Idrissi *et al.* 1997).

The higher number of specimens captured, total density and proportion of positive sites for *P. sergenti* confirm that the choice of the south-eastern area of the Iberian Peninsula was appropriate for generating the statistical model. From among the variables associated with *P. sergenti* presence, temperature has already been singled out in other studies as an important factor in sandfly distribution (Aspöck *et al.* 2008). Although this variable is usually correlated with altitude because of the direct relationship between altitude increase and temperature drop (Rivas Martínez *et al.* 1987), in this study we were able to confirm that both variables maintain their significance in the multivariate model, having observed that the risk of exposure to *P. sergenti* is higher at altitudes ranging from sea level to 1153 m (3.5 times higher) and at temperatures from 23.3 to 26.8 °C (7.9 times higher). These altitude and temperature data correspond to the altitude at which this species is usually found in this region (0–1100 m) (Guevara-Benítez *et al.* 1978), and to the temperature values of the semi-arid or sub-humid

environments which it tends to inhabit (Martínez-Ortega and Conesa-Gallego, 1987). Altitude and/or land use have been mentioned in previous studies as important factors in *P. perniciosus* distribution (Gálvez *et al.* 2010; Barón *et al.* 2011), so the significance of these two variables in the distribution of the vector sandfly species is clear. In the specific case of *P. sergenti*, the presence of rivers and natural water courses increases the risk of encountering this species by 8.7 times compared with other uses, no doubt due to the particular damp conditions commonly found in these environments. It has been noted that in certain regions the larvae of this dipteran flourish in water-rich areas such as irrigation or urban drainage channels (Lewis, 1971).

Furthermore, we found that *P. sergenti* shows a preference for environments with nearby citrus or almond orchards, in which the earth retaining walls are free from vegetation and have drainage holes with no PVC pipes in them, factors which increase the risk of encountering this vector by 3.1, 4.2 and 5.9 times respectively. Thus vegetation in walls and PVC pipes in wall drainage holes act as protection factors, reducing the presence of this sandfly, and can therefore be used as such in vector control programmes. PVC in drainage holes has been cited previously as a potential protective measure against *P. perniciosus* in this same region (Barón *et al.* 2011), which demonstrates its effectiveness in the control of vector sandflies.

We can confirm the usefulness of the risk model for detecting high-risk areas for *P. sergenti* presence, these locations being the most highly prone to the potential establishment of *L. tropica*. However, the risk model was shown to be less effective in the differentiation of risk levels below 11%, where there is less concordance between theoretical and real values, although the 'real risk' obtained always remained below 11%. Semião-Santos *et al.* (1995) noted that *P. sergenti* was the predominant sandfly species in the district of Évora. This region in the south of Portugal falls within a high-risk area in our theoretical risk model, thus demonstrating its validity for identifying areas of this type.

The highest risk of *P. sergenti* presence is concentrated in extensive areas of the centre and south of the Iberian Peninsula, with maximum values of between 78.0 and 96.3%, depending on the risk model applied. These high-risk areas represent hot spots where the establishment of an autochthonous focus of *L. tropica* would be feasible. We should point out that in order for this focus to occur, several premises would need to take place which are difficult to predict, for example the introduction of the disease via infected persons from endemic areas, or the *P. sergenti* populations found in the region displaying vectorial capacity. With regard to the introduction of the disease, the flow of immigrants from North Africa and, to a lesser extent, the Middle East is known to exist and the



presence of the parasite in these regions has been proven (Al-Zahrani *et al.* 1989; Kimutai *et al.* 2009), therefore contact between the parasite and the vector is feasible. According to the Spanish National Institute of Statistics (INE), in the year 2010 a total of 51 235 immigrants from North Africa and the Middle East entered Spain, of which 43 931 were Moroccan and 1212 from the Middle East. To this number we should add illegal immigrants, who are commonly found in this country and fall outside the control of the health authorities. During the period April 1989 to December 2007, 0·2% of immigrants who visited a Tropical Medicine Referral Unit in Spain had cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis (Norman *et al.* 2010). In Spain, the fact that most cutaneous cases remain undeclared has been verified (Alvar *et al.* 2012), and identification of the species involved is not commonplace, so the entry and establishment of a new species may be underestimated (Gramiccia and Gradoni, 2005). The importation of cases of cutaneous leishmaniasis caused by *L. tropica* has been verified in other European countries (Grimm *et al.* 1996; Antinori *et al.* 2005; Gramiccia and Gradoni, 2005; Morizot *et al.* 2007). With regard to the vector, recent studies have demonstrated the existence of a mitochondrial line of *P. sergenti* common to both Spain and northern Morocco (Barón *et al.* 2008), the latter an emerging area for *L. tropica*, which establishes a potential capacity for populations of this species in Spain to act as vectors.

It has, moreover, been suggested that climate change may affect the distribution of leishmaniasis, whether directly due to the effect of temperature on the development of the parasite within the sandfly, or indirectly due to the effect of environmental changes on the distribution and abundance/density of the vector species (Ready, 2010). Besides, the prolongation of the activity period of the vectors could have a greater effect on the transmission of the disease than the increase in density, and this prolongation could be produced by the increase in temperature (Martín-Sánchez *et al.* 2009).

In conclusion, we have demonstrated the validity of the risk model produced for detecting hot spots for certain vector-borne diseases such as ACL through analysing the presence of the vector. The risk maps generated can prove very useful when making decisions regarding the kind of prophylaxis and control measures that should be adopted. Producing these risk maps for *P. sergenti* presence in this study allowed us to confirm that various areas in the centre and south of the Iberian Peninsula may be more susceptible to the potential establishment of an autochthonous focus of *L. tropica*, due to the higher probability of encountering its vector coupled with the influx of immigrants from endemic areas, which would enable the entry of this disease into south-western Europe.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the 'Ministerio de Ciencia e Innovación' for projects CGL2007-66943-CO2-O2, CGL2007-66943-CO2-O1, CGL2010-22368-CO2-O2 and CGL2010-22368-CO2-O1; to the 'Junta de Andalucía' for project P07-CVI-03249; and to the E.U. for EDEN (GOCE-2003-010284-2).

FINANCIAL SUPPORT

The 'Junta de Andalucía' subsidises project P07-CVI-03249, the 'Ministerio de Ciencia e Innovación' subsidises projects CGL2007-66943-CO2-O2, CGL2007-66943-CO2-O1, CGL2010-22368-CO2-O2 and CGL2010-22368-CO2-O1, and EDEN provided S.D. Barón with a PhD grant.

REFERENCES

- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. and WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* 7, e35671.
- Al-Zahrani, M. A., Peters, W., Evans, P. A., Ching-Chin, I., Smith, V. and Lane, R. P. (1988). *Phlebotomus sergenti*, a vector of *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 416.
- Al-Zahrani, M. A., Peters, W., Evans, P. A., Smith, V. and Ching-Chin, I. (1989). *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 6. Cutaneous leishmaniasis of man in the south-west. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83, 621–628.
- Antinori, S., Gianelli, E., Calattini, S., Longhi, E., Gramiccia, M. and Corbellino, M. (2005). Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travelers. *Clinical Microbiology and Infection* 11, 343–346.
- Aransay, A. M., Testa, J. M., Morillas-Márquez, F., Lucientes, J. and Ready, P. D. (2004). Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitology Research* 94, 416–420.
- Aspöck, H., Gerersdorfer, T., Formayer, H. and Walochnik, J. (2008). Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wiener Klinische Wochenschrift* 120(19–20 Suppl. 4), 24–29.
- Barón, S., Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Morales-Yuste, M., Boussaa, S. and Morillas-Márquez, F. (2008). Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Tropica* 107, 259–267.
- Barón, S. D., Morillas-Márquez, F., Morales-Yuste, M., Díaz-Sáez, V., Irigaray, C. and Martín-Sánchez, J. (2011). Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* 138, 1234–1244.
- Berdjane-Brouk, Z., Koné, A. K., Djimé, A. A., Charrel, R. N., Ravel, C., Delaunay, P., del Giudice, P., Diarra, A. Z., Doumbo, S., Goita, S., Thera, M. A., Depaquit, J., Marty, P., Doumbo, O. K. and Izri, A. (2012). First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaomyia) darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *PLoS ONE* 7, e28266.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J. A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovao, J. M., Afonso, M. O. and Dedet, J. P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health* 2, 1708–1714.
- Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Lefranc, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Márquez, F., Rioux, J. A., Svobodova, M. and Volf, P. (2002). ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. *International Journal of Parasitology* 32, 1123–1131.
- Dereure, J., Rioux, J. A., Gállego, M., Perrières, J., Pratlong, F., Mahjour, J. and Saddiki, H. (1991). *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 595.
- D'Urso, V., Ruta, F., Khoury, C., Bianchi, R., Depaquit, J. and Maroli, M. (2004). About the presence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae) in Eastern Sicily, Italy. *Parasite* 11, 279–283.



- Gállego-Berenguer, J., Botet-Fregola, J., Gállego-Culleré, M. and Portús-Vinyeta, M. (1992). Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre métodos de captura. In "In memoriam" al Prof D. F. de P. Martínez Gómez (ed. Hernández, S.), pp. 581–600. Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain.
- Gálvez, R., Descalzo, M. A., Miró, G., Jiménez, M., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I. and Molina, R. (2010). Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Tropica* 115, 95–102.
- Gramiccia, M. and Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35, 1169–1180.
- Grimm, F., Gessler, M. and Brun, R. (1996). Isolation and characterization of *Leishmania* parasites imported into Switzerland – a retrospective study. *Parasitology Research* 82, 563–565.
- Guessous-Idrissi, N., Chiheb, S., Hamdani, A., Riyad, M., Bichichi, M., Hamdani, S. and Krimech, A. (1997). Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *Leishmania tropica* in north Morocco. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91, 660–663.
- Guevara-Benitez, D., Úbeda-Ontiveros, J. M. and Morillas-Márquez, F. (1978). *Phlebotominae* de la provincia de Granada: estudio de poblaciones. *Revista Ibérica de Parasitología* 38, 813–839.
- Guilvard, E., Rioux, J. A., Gállego, M., Pratlong, F., Mahjour, J., Martínez-Ortega, E., Dereure, J., Saddiki, A. and Martini, A. (1991). *Leishmania tropica* au Maroc. III. Rôle vecteur de *Phlebotomus sergenti*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 66, 96–99.
- Guilvard, E., Gállego, M., Moreno, G., Fisa, R., Rispail, P., Pratlong, F., Martínez-Ortega, E., Gállego, J. and Rioux, J. A. (1996). Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne). *Parasite* 3, 191–192.
- Kamhawi, S., Modi, G. B., Pimenta, P. F., Rowton, E. and Sacks, D. L. (2000). The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology* 121, 25–33.
- Kimutai, A., Kamau Ngure, P., Kiprotich Tonui, W., Muita Gicheru, M. and Bonareri Nyamwamu, L. (2009). Leishmaniasis in northern and western Africa: a review. *African Journal of Infectious Diseases* 3, 14–25.
- Lewis, D. J. (1971). Phlebotomid sandflies. *Bulletin of the World Health Organization* 44, 535–551.
- Martínez-Ortega, E. (1986). Biología de los flebotomos Ibéricos (Diptera, Psychodidae) en condiciones naturales. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 22, 73–78.
- Martínez-Ortega, E. (1988). Caracterización de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) en el sureste de la Península Ibérica. *Revista Ibérica de Parasitología* 48, 79–87.
- Martínez-Ortega, E. and Conesa-Gállego, E. (1987). Estructura de las poblaciones de flebotomos (Dipt., Psychodidae) del sureste de la Península Ibérica. *Mediterránea Serie de estudios Biológicos* 9, 87–99.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A. and Morillas-Márquez, F. (2004). Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 228–232.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V. and Morillas-Márquez, F. (2009). Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases* 15, 795–798.
- Morillas-Márquez, F., Guevara Benitez, D. C., Úbeda Ontiveros, J. M. and González Castro, J. (1983). Fluctuations annuelles des populations de flebotomos (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 58, 625–632.
- Morizot, G., Delgiudice, P., Caumes, E., Laffitte, E., Marty, P., Dupuy, A., Sarfati, C., Hadj-Rabia, S., Darie, H., Le Guern, A. S., Salah, A. B., Pratlong, F., Dedet, J. P., Grögl, M. and Buffet, P. A. (2007). Healing of Old World cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: drug effect or spontaneous evolution? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76, 48–52.
- Norman, F. F., Pérez de Ayala, A., Pérez-Molina, J. A., Monge-Maillo, B., Zamarrón, P. and López-Vélez, R. (2010). Neglected tropical diseases outside the tropics. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e762. doi: 10.1371/journal.pntd.0000762.
- Pratlong, F., Rioux, J. A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G. and Dedet, J. P. (2004). Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4077–4082.
- Ramaoui, K., Guernaoui, S. and Boumezzough, A. (2008). Entomological and epidemiological study of a new focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *Parasitology Research* 103, 859–863. doi: 10.1007/s00463-008-1068-3.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *EuroSurveillance* 15, pii=19505.
- Ready, P. D. (2011). Should sand fly taxonomy predict vectorial and ecological traits? *Journal of Vector Ecology* 36(Suppl. 1), S17–S22.
- Rioux, J. A., Houin, R., Baudouy, J. P., Croset, H. and Tour, S. (1970). Présence en Corse de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 45, 343–356.
- Rioux, J. A., Croset, H. and Lanotte, G. (1977). Écologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation. *Colloque International CNRS* 39, 295–305.
- Rioux, J. A., Jarry, D., Maazoun, R. and Wallbanks, K. (1982). Confirmation de l'existence en France continentale de *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917. *Annales de Parasitologie* 57, 647–648.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Petter, F., Dereure, J., Akalay, O., Pratlong, F., Velez, I. D., Fikri, N. D., Maazoun, R., Denial, N. et al. (1986). Les leishmanioses cutanées du bassin méditerranéen occidental; De l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique; L'exemple de trois "foyers", tunisien, marocain, et français. In *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Eco-épidémiologiques* (Int Coll CNRS/INSERM/OMS (2–6 July 1984)), pp. 365–395. Institut Méditerranéen d'Etudes Épidémiologiques et Écologiques, Montpellier, France.
- Rivas Martínez, S., Bandullo, J. M., Serrada, R., Allue Andrade, J. L., Moreno del Burgo, J. L. and González Rebollar, J. L. (1987). *Memoria del Mapa de series de vegetación de España* (ed. ICONA). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain.
- Schnur, L. F., Nasereddin, A., Eisenberger, C. L., Jaffe, C. L., El Fari, M., Azmi, K., Anders, G., Killick-Kendrick, M., Killick-Kendrick, R., Dedet, J. P., Pratlong, F., Kanaan, M., Grossman, T., Jacobson, R. L., Schonian, G. and Warburg, A. (2004). Multifarious characterization of *Leishmania tropica* from a judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70, 364–372.
- Semenza, J. C. and Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infectious Diseases* 9, 365–375.
- Semião-Santos, S. J., el Harith, A., Ferreira, E., Pires, C. A., Sousa, C. and Gusmão, R. (1995). Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitology Research* 81, 235–239.
- Senghor, M. W., Faye, M. N., Diarra, K., Elguero, E., Gay, O., Bañuls, A. L. and Niang, A. A. (2011). Ecology of phlebotomine sand flies in the rural community of Mont Rolland (Thiès Region, Sénégal): area of transmission of canine leishmaniasis. *PLoS ONE* 6, e14773.
- Srivastava, A., Nagpal, B. N., Joshi, P. L., Paliwal, J. C. and Dash, A. P. (2009). Identification of malaria hot spots for focused intervention in tribal state of India: a GIS based approach. *International Journal of Health Geographics* 8, 30. doi: 10.1186/1476-072X-8-30.
- Svobodova, M., Votycka, J., Peckova, J., Dvorak, V., Nasereddin, A. F., Baneth, G., Sztern, J., Kravchenko, V., Orr, A., Meir, D., Schnur, L. F., Volf, P. and Warburg, A. (2006). Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, northern Israel. *Emerging Infectious Diseases* 12, 1860–1868.





4. DISCUSIÓN GENERAL





4. DISCUSIÓN GENERAL

En la Península Ibérica, *Leishmania infantum* es la única especie responsable de la leishmaniosis humana, tanto cutánea como visceral, canina y de otros hospedadores (Martín-Sánchez et al., 2004; Pratlong et al., 2004; Campino et al., 2006; Gálvez et al 2010b; Morales-Yuste et al., 2011; Alcover et al., 2012; Pratlong et al., 2013). A principios del siglo XX se describieron los primeros casos de leishmaniosis cutánea y visceral humana, y canina en la provincia de Granada (Fernández Martínez y Camacho Alexandre, 1913). Desde este momento a la actualidad son muchos los estudios que se han realizado en esta provincia sobre la incidencia en humanos y perros, así como sobre sus vectores. Morillas Márquez et al. (2010), en un repaso sobre la leishmaniosis en Granada en los últimos 25 años, menciona una tasa media de 0'4 (casos humanos anuales/100000 habitantes) en esta provincia entre 1984 y 2005, siendo la segunda tasa más alta de Andalucía, y observándose que la tendencia general en el número de casos muestra un ligero aumento a lo largo de estos años. Sin embargo, se ha comprobado que estos datos oficiales están subestimados. Por ejemplo, en la provincia de Granada se declararon 6 casos de leishmaniosis entre 1984 y 1986, mientras que solo en el Hospital de San Cecilio de Granada se diagnosticaron 12 casos en este mismo periodo. Además habría que sumar los casos de leishmaniosis asintomática, que no se pueden declarar y que pueden llegar a suponer hasta el 60% de los casos de coinfección *Leishmania*-VIH (Pineda et al., 1998) y hasta el 24% en inmunocompetentes (Martín-Sánchez et al., 2004). En estos últimos 25 años, también se ha comprobado que las densidades de *P. perniciosus* y *P. ariasi*, únicos vectores demostrados de *L. infantum* en España, han permanecido constantes en el Termomediterráneo, y han descendido en el Mesomediterráneo, a la vez que ha aumentado el periodo de actividad de *P. perniciosus* (Morillas-Márquez et al., 2010; Morales-Yuste, 2012). En cuanto a la leishmaniosis canina, desde 1984 hasta el 2006 se ha producido un incremento de la seroprevalencia del 9'4% al 13'0%. El aumento es más evidente si atendemos solo al matiz bioclimático Mesomediterráneo, ya que



ha pasado del 9,2% en 1984 al 20'1% en 2006. Estos cambios en la seroprevalencia podrían haberse visto favorecidos por el aumento del periodo de actividad de *P. perniciosus*, pudiendo ser estos efectos más importantes en el mesomediterráneo debido a que es el matiz bioclimático que presenta una mayor densidad de esta especie vectora (Martín-Sánchez et al., 2009; Morillas Márquez et al., 2010).

Aunque en el suroeste europeo no se han detectado casos autóctonos de leishmaniosis cutánea producida por *Leishmania tropica*, el sur de la Península Ibérica es una zona susceptible de sufrir la introducción de este flagelado debido a la proximidad con el norte de Marruecos (zona emergente de Leishmaniosis Cutánea Antroponótica (LCA))(Guessous-Idrissi et al., 1997b; Rhajaoui et al., 2004), al flujo migratorio humano entre ambos territorios, y a la presencia de su principal vector (*P. sergenti*) (Gil Collado et al., 1989; Gállego Berenguer et al., 1992; Afonso et al., 2005; Gálvez et al., 2010a; Morales-Yuste, 2012; Maia et al., 2013). El hecho de que *L. infantum* sea endémica en nuestro país, así como el riesgo de introducción de *L. tropica*, pone de manifiesto el interés de analizar la situación actual de estas parasitosis. Como la transmisión de la leishmaniosis está ligada a la presencia de sus vectores, el análisis se ha realizado mediante el estudio de la distribución y la composición de las poblaciones de sus principales vectores, intentando dilucidar sus posibles implicaciones epidemiológicas.

En España, entre las 11 diferentes especies de flebotomo halladas hasta la fecha, se ha demostrado la amplia presencia de *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* (principales vectores de *L. infantum*), y de *P. sergenti* (principal vector de *L. tropica*)(Gil Collado et al., 1989; Gállego Berenguer et al., 1992; Martín-Sánchez et al., 1994; Martín-Sánchez et al., 1996; Morillas et al., 1996; Conesa Gallego et al., 1999; León-Sanz et al., 1999; Aransay et al., 2004; Ready, 2013). El hecho de que *P. sergenti* sea considerado como el principal vector de la LCA causada por *L. tropica*, se basa en su distribución y en el hallazgo de este protozoo en ejemplares de *P. sergenti* capturados en zonas endémicas (Al-Zaharani et al., 1988;



Guilvard et al., 1991; Schnur et al., 2004; Moncaz et al., 2012; Ajaoud et al., 2013; Aghaei et al., 2014). Kamhawi et al. (2000) confirmaron que en *P. sergenti* se puede producir el desarrollo completo de *L. tropica*, y revelaron que es refractario a otras especies de *Leishmania* del Viejo Mundo. En el caso de los vectores de *L. infantum*, ambos pueden actuar en condiciones simpátricas en el mismo foco (Rioux et al., 1986a; Martín-Sánchez et al., 1994; Alcover et al., 2012) y su relativa importancia como vectores va a depender de su abundancia y densidad relativas (Guevara Benítez et al., 1978; Morillas Márquez et al., 1983; Gil Collado et al., 1989).

En el desarrollo de este estudio, se han obtenido los datos de captura de 167 estaciones de muestreo distribuidas por varias zonas de la provincia de Granada, de las cuales se han obtenido a su vez los datos ecológicos y climáticos. Hemos observado que, utilizando como método de captura las trampas adhesivas, la especie más frecuente en el sur de la provincia de Granada es *S. minuta*, seguida de *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, *P. ariasi* y *P. alexandri* (Anexo: Tablas 1-3). Es conocido que el método de captura puede afectar al número y abundancia relativa de cada una de las especies. El hecho de que la especie más frecuente sea *S. minuta* se debe principalmente a la utilización de trampas adhesivas, ya que si el método de captura utilizado son las trampas de luz el número de capturas de *S. minuta* es considerablemente inferior (Gállego Berenguer et al., 1992). La tradicional naturaleza herpetofílica definida para esta especie hace que no se considere importante en la epidemiología de la leishmaniosis debida a *L. infantum* o a *L. tropica*. Sin embargo, al haberse relacionado con la transmisión de virus Toscana (Charrel et al., 2006), haber sido detectado ADN de *Mus musculus* (ratón) en hembras alimentadas (Jaouadi et al., 2013), y haberse encontrado infectada con *L. major* en Portugal (Campino et al., 2013), no se puede descartar que se alimente también de mamíferos y su posible implicación como vector de *Leishmania*. Pero no es el único caso, el género *Sergentomyia* también se ha relacionado recientemente con otras especies de *Leishmania*, como son *L. infantum* en Senegal (Senghor et al., 2011), *L. major* en Mali



(Berdjane-Brouk et al., 2012), *L. major* y *L. tropica* en Ghana (Nzeli et al., 2014), y *L. siamensis* en Tailandia (Kanjnopas et al., 2013); y en la transmisión de virus (Depaquit et al., 2010)

En la provincia de Granada, *P. perniciosus* es el principal vector de *L. infantum* debido a que tiene una mayor densidad, abundancia y distribución que *P. ariasi*. Según los datos obtenidos, *P. perniciosus* está presente en el 67'07% de las estaciones muestreadas, su abundancia total es del 7'51% y su densidad total es de 11'03 ejemplares/m², mientras que *P. ariasi* sólo está presente en el 32'93%, su abundancia es del 0'75% y su densidad de 1'10 ejemplares/m². Este papel predominante de *P. perniciosus* respecto a *P. ariasi* también se ha puesto de manifiesto en otras regiones españolas (Arnedo Peña et al., 1994; Lepe et al., 2000; Martínez Ortega, 1985; Morillas et al., 1996; Sanchís-Marín et al., 1997; Sanchís-Marín et al., 1986b; Gálvez et al., 2010a; Durán-Martínez et al., 2013; Ballart et al., 2014), por lo que se considera que en nuestro país *P. perniciosus* presenta una mayor importancia en la epidemiología de la leishmaniosis debida a *L. infantum* que *P. ariasi*. Además, se ha podido observar que al contrario que en estudios anteriores desarrollados en la misma zona (Guevara Benítez et al., 1978; Morillas Márquez et al., 1983; Morales-Yuste, 2012), *P. ariasi* ha pasado de ser la tercera especie con mayor abundancia a ser la quinta. Es importante mencionar que en el 90'91% de las estaciones en las que está presente *P. ariasi* también hay *P. perniciosus*. Además, de todas las estaciones en las que podemos localizar a ambos vectores, en el 94% de los casos la abundancia de *P. perniciosus* es mayor o igual que la de *P. ariasi*, hecho que nuevamente confirma el papel vectorial predominante de *P. perniciosus*.

Aunque *P. perniciosus* es considerado el principal vector de *L. infantum* en la Península Ibérica, la capacidad vectorial de *P. ariasi* ha sido demostrada en multitud de regiones en las que se ha comprobado su infección con varios zimodemos de *L. infantum*, tales como Andalucía y Cataluña en España, Arrábida y Alto Douro en Portugal, Gard-Cevennes y Niza-Alpes Marítimos en Francia, y Taounate en



Marruecos entre otras (Alves-Pires, 1984; Rioux et al., 1984; Izri et al., 1992; Guilvard et al., 1996; Morillas et al., 1996; Guessous-Idrissi et al., 1997a; Pratlong et al., 2004; Marty et al., 2007; Alcover et al., 2012). También es importante destacar que, en determinadas regiones del sur de Francia y del norte de España, y en Andorra, se ha comprobado que *P. ariasi* es predominante sobre *P. perniciosus* por lo que su importancia como vector de la leishmaniosis sería mayor (Rioux et al., 1980; Aransay et al., 2004; Ballart et al., 2012; Rioux et al., 2013). Alcover et al. (2012) observaron que Ainet de Besan, localidad situada en el norte de Lérida, podría ser un nuevo foco de leishmaniosis canina, y que el principal papel vectorial lo desempeñaba *P. ariasi*, debido a que su presencia era mayor que la de *P. perniciosus* y a que se encontraron varias hembras de *P. ariasi* infectadas con *L. infantum*.

P. sergenti parece haber aumentado su presencia en nuestro país, capturándose en el 24'60% de las estaciones, y teniendo una densidad total de 1'35 ejemplares/m². La abundancia observada fue del 0'90%, aunque este valor está infravalorado debido a la elección de las trampas adhesivas como método de captura, mediante el cual el mayor número de capturas corresponden a la especie *S. minuta* como ya hemos comentado anteriormente (Gállego Berenguer et al. 1992). Si se tienen en cuenta sólo las especies pertenecientes al género *Phlebotomus* (Anexo: Tabla 4) la abundancia aumenta hasta el 9'1%. Cabe destacar que en determinadas localizaciones la densidad y abundancia de *P. sergenti* puede aumentar significativamente, alcanzando valores de 35'27 ejemplares/m² y representando hasta el 75% de las capturas. Esta densidad máxima se ha obtenido en una estación de muestreo situada entre los pueblos de Albuñol y Sorvilán, perteneciente al matiz bioclimático Termomediterráneo y en la que, curiosamente, se ha producido la única captura de *P. alexandri*. La abundancia del 75% se ha alcanzado en una estación situada en Cherín, población perteneciente al municipio de Ugíjar que está englobada en el matiz bioclimático Termomediterráneo, con valores superiores a los observados para *P. perniciosus* en ese mismo punto. Esta localidad se encuentra solo a un



kilómetro de la provincia de Almería, en la que este matiz bioclimático está bien representado. En focos marroquíes emergentes de *L. tropica*, se ha observado que la densidad de *P. sergenti* varía entre 4-16 ejemplares/m² (Ramaoui et al., 2008), y Rioux et al. (1986b) mencionan una densidad de 1'79 ejemplares/m² en un foco típico de LCA causado por *L. tropica* localizado en zonas áridas de Túnez. Además, en estudios anteriores se ha mencionado que valores de densidad ≥ 4 ejemplares/m² de *P. perniciosus* incrementan el riesgo de transmisión de *L. infantum* en perros (Martín-Sánchez et al., 2009), y que en áreas del sur de Francia (Cevennes) donde la densidad de *P. ariasi* es ≥ 5 ejemplares/m² aparecen casos de leishmaniosis canina (Rioux et al., 1977). A pesar del hecho de que las dinámicas de transmisión pueden ser muy diferentes, como una aproximación podemos asumir que los datos anteriores referentes a *L. infantum* pueden ser extrapolados al caso de *P. sergenti/L. tropica*. Esto podría indicar que la Península Ibérica presenta áreas en las que la densidad de *P. sergenti* es suficiente para que estos flebotomos sean capaces de actuar como vectores. Además, algunos estudios muestran la afinidad bioclimática entre el norte de Marruecos y el sudeste de la Península Ibérica, así como la alta concordancia de las especies de flebotomo encontradas en cada nivel bioclimático (Martínez Ortega, 1988). Estos hechos, unidos a otros factores, podrían indicar un cierto riesgo de introducción de *L. tropica* de forma igual a lo sucedido en el norte de Marruecos (Guessous-Idrissi et al., 1997b).

Desde hace varios años ha crecido el interés por el análisis de las variaciones geográficas entre poblaciones de diferentes especies de *Phlebotomus* mediante la comparación de secuencias de varios genes como son el gen ribosomal ITS-2 (Espaciador Interno Transcrito) o los mitocondriales ND4 (NADH deshidrogenasa, subunidad 4) y Cyt b (Citocromo b) (Moin-Vaziri et al., 2007; Depaquit et al., 2008; Belen et al., 2011; Depaquit et al., 2013). A través de ellos se ha ampliado nuestro conocimiento sobre la estructura genética de estas especies y de su potencial implicación en la epidemiología de la leishmaniosis.



Tanto en el suroeste europeo como en España, a pesar de no haberse reportado ningún caso autóctono de *L. tropica*, se ha observado la presencia de *P. sergenti* en gran parte del país, tal y como hemos mencionado anteriormente. Sin embargo, se ha sugerido que, tanto la presencia de este vector en zonas libres del parásito como las diferencias en los patrones de transmisión de la LCA, pueden ser debidos a la existencia de razas o especies crípticas del mismo (Depaquit et al., 2002; Yahia et al., 2004; Boussaa et al., 2009). El hecho de que estas diferencias solo puedan ser detectadas mediante técnicas bioquímicas y moleculares, las similitudes existentes en la fenología de los ejemplares españoles y marroquíes (Sanchís-Marín et al., 1986a; Martínez-Ortega y Conesa Gallego, 1987a; Guessous-Idrissi et al., 1997b; Guernaoui et al., 2005), y las características climáticas comunes en determinadas zonas de ambas regiones (Martínez Ortega, 1988), indican la importancia de realizar un estudio de la variación molecular de poblaciones de *P. sergenti* de ambos países.

En total se han analizado las secuencias de 58 individuos de *P. sergenti*, y hemos podido detectar que las poblaciones de *P. sergenti* presentan una gran diversidad, obteniéndose 3 haplotipos ribosomales y 7 mitocondriales en España, y 3 haplotipos ribosomales y 10 mitocondriales en Marruecos. En total se han obtenido 5 haplotipos ribosomales y 16 haplotipos mitocondriales, debido a que en ambos casos hay un haplotipo común entre España y Marruecos, englobándose todos ellos en una única línea ribosomal y 4 líneas mitocondriales, con un buen soporte de bootstrap. La escasas diferencias entre los haplotipos ribosomales, el hecho de que todos formen parte de una misma línea ribosomal, y la gran variabilidad observada en las secuencias mitocondriales, pone de manifiesto la mayor utilidad del ADN mitocondrial para la realización de los estudios intraespecíficos de este díptero.

La línea mitocondrial III, que es la que incluye al haplotipo común a ambos países “M-A/S-F Cyt b”, está ampliamente representada en el norte de Marruecos (zona emergente de LCA), y engloba a un total de 6 haplotipos con 1-5 diferencias. En



España está formada por este haplotipo común, que representa el 44'4% del total de ejemplares españoles secuenciados, y en menor grado por el haplotipo S-G que difiere del anterior en una única base. La línea III coincide con la llamada “línea Taza” de Yahia et al. (2004) que fue encontrada en los tres focos de LCA investigada por dichos autores. El resto de líneas mitocondriales halladas por ellos también son coincidentes por las obtenidas en el presente estudio, excepto la línea I que es exclusivamente española. La gran diversidad genética observada en *P. sergenti* es consistente con la hipótesis de dispersión de este vector mencionada por Depaquit et al. (2000, 2002), que indica la colonización de España por este vector desde Marruecos hace aproximadamente 5 millones de años. El agrupamiento de las poblaciones de España, Marruecos e Italia en el árbol filogenético de ITS-2 (DNAr) también estaría de acuerdo con la ruta migratoria propuesta por ellos. Cabe destacar que, según varios estudios intraespecíficos realizados en *P. sergenti*, las diferencias dentro de las poblaciones de esta especie se deben más probablemente a variaciones intraespecíficas que a la existencia de especies hermanas (Depaquit et al., 2002; Dvorak et al., 2006), aunque otros autores establecen la posibilidad de que *P. sergenti* esté formado por un grupo de especies crípticas (Boussa et al., 2009). La presencia en España de una línea mitocondrial de *P. sergenti* exclusiva junto con una común con el norte de Marruecos donde la LCA es endémica y/o emergente podría tener importantes repercusiones epidemiológicas, por lo sería necesario averiguar si hay diferencias en la capacidad vectorial de ambas líneas de *P. sergenti*.

En el caso de los vectores de *L. infantum*, distintos análisis comparativos de las secuencias de genes mitocondriales mostraron que la especie *P. perniciosus* presenta dos líneas mitocondriales distintas, una “línea típica” encontrada en Marruecos, Túnez, Malta e Italia, y una “línea ibérica” en España, que se diferencian en dos sitios polimórficos fijos (Esseghir et al., 1997; Esseghir et al., 2000; Aransay et al., 2003; Pesson et al., 2004; Perrotey et al., 2005). Se han identificado 4 haplotipos de la “línea típica” y 2 de la Ibérica (Esseghir et al., 1997; Esseghir et al., 2000; Pesson et al.,



2004). Además se ha encontrado que la “línea típica” se divide en dos sublinajes diferenciados por 3 sitios polimórficos fijos (Pesson et al., 2004). En otro estudio similar llevado a cabo en 16 localidades del norte, centro y sur de España, Aransay et al. (2003) secuenciaron 30 ejemplares de *P. perniciosus* del norte y centro de la península, perteneciendo todos ellos a la “línea ibérica”. En este mismo estudio, se observó que esta línea se diferenciaba en dos poblaciones mediante el análisis de microsatélites, una que englobaba a los ejemplares del norte y otra que lo hacía con los del centro y sur, lo cual es consistente con la hipótesis de migración desde zonas del sur peninsular. Los trabajos anteriores sugirieron que durante el Pleistoceno *P. perniciosus* sobrevivió en Europa en refugios situados en el sur de España e Italia, desde los que pudieron sufrir una dispersión postglacial. Por su parte, Perrotey et al. (2005) identificaron 3 haplotipos de cada una de las líneas mitocondriales de *P. perniciosus* mediante el alineamiento de varias secuencias propias junto con algunas de las publicadas por Essenghir et al. (1997) y Pesson et al. (2004), y mencionaron que cuando estas líneas se encuentran en el noroeste de España y sur de Francia se produce entre ellas introgresión genética. Peyrefitte et al. (2013) determinaron la existencia en Francia de dos haplotipos coincidentes a los propuestos por Perrotey et al. (2005) y 5 haplotipos adicionales, no perteneciendo ninguno de ellos a la “línea ibérica”.

Los pocos estudios moleculares existentes sobre *P. ariasi* parecen mostrar una cierta heterogeneidad y estructuración geográfica de sus poblaciones. Por ejemplo, en Cevennes (sur de Francia), se identificaron dos poblaciones mediante el análisis de sus hidrocarburos cuticulares (Kamhawi et al., 1987), y en Andalucía (Sur de España) mediante el uso de técnicas de RAPD también se identificaron dos poblaciones distintas, asociadas con áreas que presentaban diferentes características bioclimáticas (Martín-Sánchez et al., 2000). Por esta razón se ha creído necesario realizar también un estudio intraespecífico de esta especie vectora, con el fin de comprobar la composición de sus poblaciones y su posible repercusión en la



epidemiología de *L. infantum*, de manera similar a lo que ya se ha hecho con *P. perniciosus*.

En total se han analizado las secuencias del Cyt b de 133 ejemplares, morfológicamente identificados como *P. ariasi*, procedentes de 35 localidades pertenecientes a 11 regiones de 5 países distintos. Esta especie presenta una amplia diversidad intraespecífica observándose hasta 45 haplotipos que se diferencian en 1-26 bases. Los haplotipos hallados están distribuidos en dos líneas mitocondriales, una de ellas limitada geográficamente a Argelia y la otra distribuida por el resto de países del mediterráneo. La línea de Argelia está formada por un único haplotipo (H45). De acuerdo a la calibración molecular de eventos de especiación en *Phlebotomus* y *Larroussius* realizado por Essegir et al. (1997), la separación de estos dos linajes genéticos puede haberse producido hace 4'7-2'7 millones de años, con la reorganización tectónica de la subregión del mediterráneo oriental en el Plioceno, un periodo que también ha sido identificado como el punto de aislamiento de *P. perniciosus* y *P. tobbi*.

De los 44 haplotipos definidos en la línea Europea/Marroquí de *P. ariasi*, el mayor número se encuentran en Andalucía con 16, con la peculiaridad de que 13 de ellos sólo se encuentran en esta comunidad autónoma. Las siguientes regiones serían Madrid con 9, Alto Douro (Portugal) y Gard (Francia) con 8, Herault (Francia) con 6, Cataluña con 5, Bouches du Rhon (Francia) con 3, y Arrábida (Portugal) y Marrakech (Marruecos) con 1. Es importante destacar que han sido pocos los ejemplares de Marruecos estudiados por lo que sería conveniente realizar un estudio con un número mayor de individuos de esta región. A pesar de que los valores de bootstrap son bajos, los haplotipos obtenidos se agrupan en 4 haplogrupos o ramas en los que siempre hay presente un representante de Andalucía, lo que podría demostrar la hipótesis de que el sur de España actuó como un refugio para estos dípteros durante el Pleistoceno, y posteriormente se produjo su dispersión desde esta región (Essegir et al., 2000; Aransay et al., 2003; Pesson et al., 2004). En un trabajo similar sobre *P.*



ariasi, Mahamdallie et al. (2011) encontraron 94 haplotipos divididos en 5 haplogrupos y definidos por 84 polimorfismos en 19 localidades de Francia y la Península Ibérica, lo que confirma la gran variabilidad genética que presenta esta especie. De entre estos Haplogrupos cabe destacar que el A es el principal (54 haplotipos), que el F está solo presente en Marruecos y todos los ejemplares de esta región están incluidos en él, y que el B es el menos frecuente aunque está omnipresente con moderada frecuencia en los Pirineos franceses. Estos autores propusieron dos posibles focos de dispersión de *P. ariasi* durante el Pleistoceno y el Holoceno, uno desde España, lo que estaría de acuerdo con lo expuesto anteriormente, y otro desde los Pirineos orientales franceses cuyos haplotipos en ningún caso aparecen en el resto de poblaciones analizadas de Francia, España y Portugal. En las poblaciones naturales se espera que los haplotipos ancestrales perduren y que sean capturados junto a sus descendientes, lo cual implica que los haplotipos más frecuentes en nuestro caso (H10, H22, H36 y H1) probablemente han estado en la población durante un largo periodo de tiempo, y a partir de ellos han ido surgiendo el resto de haplotipos mediante mutaciones. En la red definida por el programa TCS, se muestra a H10 como el haplotipo ancestral, y su ausencia en Andalucía estaría en contra de la hipótesis de dispersión a partir de esta región, aunque la presencia del haplotipo H12 (derivado del H10 mediante mutación) podría ser un indicio de la presencia de H10 en Andalucía.

La divergencia genética mostrada por *P. sergenti* y *P. ariasi* podría implicar a genes que afectan a sus capacidades vectoriales, al igual que pasa con *Lutzomyia longipalpis* (principal vector de *L. infantum* en el nuevo mundo), especie que se cree que está formada por un complejo de 3 o más especies hermanas con distinto papel vectorial (Yin et al., 2000; Arrivillaga et al., 2002; Maingon et al., 2008). De igual manera en Sri Lanka se han identificado dos especies hermanas de *P. argentipes* (mediante el análisis del Cyt b e ITS-2 entre otros genes) de las que sólo una parece presentar capacidad vectorial (Gajapathy et al., 2013). Sin embargo, en nuestro caso



es muy difícil poder establecer si se producen o no estas diferencias en la capacidad vectorial entre los distintos haplotipos o haplogrupos de *P. ariasi*, aunque podrían ser uno de los factores responsables de la heterogeneidad epidemiológica de los focos de leishmaniosis causados por *L. infantum*, entre otros muchos factores implicados.

Además de los ejemplares de *P. ariasi*, se han secuenciado 3 individuos de *P. chadlii*, que sorprendentemente se han situado entre las dos líneas de *P. ariasi* en todos los métodos de análisis filogenéticos con un buen soporte de bootstrap. La mejor garantía para verificar que una hipótesis de relación es sólida es la congruencia entre los caracteres morfológicos y los genéticos, pero en este caso no es así. En principio, una nueva especie solo debería establecerse cuando existe la certeza de que, además de la existencia de diferencias de naturaleza morfológica, hay barreras de una naturaleza estructural, ecológica o etológica que impiden una hibridación con las especies filogenéticamente más cercanas. Por lo tanto, la descripción en Rioux et al. (1966) de *P. chadlii* como una nueva especie solo respondería a criterios morfológicos. Sin embargo, es posible que se haya producido una introgresión mitocondrial interespecífica que haya ocasionado esta incongruencia entre la filogénia del Cyt b y la morfotaxonomía, aunque no se puede confirmar debido a que no se ha estudiado ningún gen cuya herencia implique recombinación. Por ejemplo, Pesson et al. (2004) muestran la existencia de hibridación interespecífica entre *P. perniciosus* y *P. longicuspis* lo que significa, junto a la existencia de una nueva especie hermana, que las previas citas de las dos morfoespecies no necesariamente reflejan sus verdaderos papeles vectoriales o distribución ecológica y geográfica. Mazzoni et al. (2008) confirman la introgresión entre *Lu. intermedia* y *Lu. whitmani* (importantes vectores de leishmaniosis cutánea americana) lo que podría indicar que estas dos especies no están totalmente aisladas reproductivamente y pueden ser capaces de compartir genes que controlen aspectos de su capacidad vectorial. En el estudio realizado por Mahamdallie et al. (2011), *P. chadlii* aparece íntimamente relacionado con las poblaciones de *P. ariasi* pero fuera del grupo formado por esta última especie.



Aún así, se puede considerar que se trata de una posición similar a la ocupada en nuestro estudio debido a que no se han incluido ejemplares de Argelia, que son los que forman la segunda línea mitocondrial de *P. ariasi*. Es necesario confirmar estos resultados preliminares con el análisis de al menos dos genes con diferentes tipos de herencia en un mayor número de individuos de *P. chadlii* y de la línea de Argelia de *P. ariasi*.

Una vez analizada la variabilidad genética de las poblaciones de los principales vectores de *L. infantum* y *L. tropica*, el siguiente paso ha sido estudiar los factores ambientales que determinan su presencia. La obtención de estos parámetros ambientales va a tener como principal finalidad la construcción de modelos predictivos y mapas de riesgo de presencia/ausencia de estos vectores, que van a permitir un mejor conocimiento de la epidemiología de la leishmaniosis, y mayor eficacia en la elaboración de medidas de profilaxis y control.

El alto número de ejemplares capturados, la proporción de puntos de muestreo positivos de *P. perniciosus* y *P. sergenti* y la gran variabilidad bioclimática, confirman que la elección del sureste de la Península Ibérica es adecuada para la construcción de modelos predictivos de la presencia de estos dípteros. Además, el sur de la provincia de Granada es un área que incluye altitudes de 0 a 3480 metros sobre el nivel del mar en pocos kilómetros de distancia, incluyendo varios matices bioclimáticos con diferentes características ambientales y de vegetación en un rango geográfico estrecho: Termomediterráneo, Mesomediterráneo, Supramediterráneo, Oromediterráneo y Criomediterráneo. Así, se han obtenido datos de la presencia/ausencia de ambos vectores en las 167 estaciones de muestreo mencionadas anteriormente, de las cuales se han obtenido a su vez los datos ecológicos y climáticos relacionados. A través de análisis de regresión logística se han estimado las probabilidades de presencia de estos dípteros en función de las variables medioambientales. A pesar de que en el estudio univariante la probabilidad de presencia de *P. perniciosus* aparece asociada a un gran número de variables (hasta



21 variables distintas), en el modelo de regresión logística multivariante sólo la altitud, el uso del terreno (CORINE) y la forma de construcción de los agujeros de drenaje (con o sin tuberías de PVC) se han retenido como predictores de la distribución de esta especie vectora. Algo similar ha pasado también con *P. sergenti* (12 variables asociadas a su presencia en los modelos univariantes), aunque en este caso las variables estadísticamente significativas en el modelo multivariante han sido: altitud, uso del terreno (CORINE), temperatura de la superficie terrestre (LST), orientación, cubierta del terreno adyacente, presencia/ausencia de vegetación en el muro de contención y presencia/ausencia de tubos de PVC en los agujeros de drenaje.

Como se puede observar, tanto la altitud como el uso del terreno actúan como variables predictoras de la presencia de ambas especies. La importancia de estas variables también ha sido mencionada en otros estudios dentro de la Península Ibérica (Gálvez et al., 2010a; Ballart et al., 2014). La temperatura se ha asociado anteriormente como un factor determinante en la distribución y supervivencia de los flebotomos (Thomson et al., 1999; Aspöck et al., 2008; El-Badry et al., 2008; Alarcón-Elbal et al., 2011; Durán-Martínez et al., 2013; Ballart et al., 2014), al igual que la altitud (Guernaoui et al., 2006; Maroli et al., 2008; Ballart et al., 2014) y el uso del terreno (King et al., 2004; Cecchi et al., 2008; Claborn et al., 2008; Durán-Martínez et al., 2013; Ballart et al., 2014). En nuestro estudio la temperatura ha resultado ser un condicionante de la presencia de *P. sergenti* pero no se ha retenido esta variable en el modelo multivariante de *P. perniciosus*. Sin embargo, esta variable está normalmente correlacionada con la altitud por la relación directa entre el aumento de la altitud y el descenso de la temperatura (Rivas Martínez et al., 1987), por lo que es posible que haya perdido su significación por esta correlación. Por el contrario, en Lérida si se ha establecido relación entre la temperatura y este díptero (Ballart et al., 2014). En el caso de *P. sergenti*, el riesgo de exposición a este vector es mayor en altitudes de 0 a 1153 m (3'5 veces mayor) y a temperaturas de 23'3-26'8°C (7'9 veces



mayor), siempre a igualdad de las demás variables. Estos datos se corresponden con la altitud a la que se suele encontrar esta especie en esta región (0-1100 m)(Guevara Benítez et al., 1978), y a los valores de temperatura de ambientes semiáridos o subhúmedos en los que suelen vivir (Martínez-Ortega y Conesa-Gallego 1987). En el caso de *P. perniciosus*, esta especie tiene una mayor presencia entre 769 y 1153 m sobre el nivel del mar, cubriendo parte del Mesomediterráneo y el Supramediterráneo, lo que en líneas generales coincide con los datos proporcionados anteriormente por Guevara Benítez et al. (1978). Aunque Ballart et al. (2014) mencionan que en la provincia de Lérida se localiza principalmente a altitudes por debajo de 800 m, se confirma la preferencia por estos dos matices bioclimáticos. Los cambios en el uso del terreno provocan alteraciones en el microhabitat que rodea a las estaciones de muestreo, afectando por lo tanto a las poblaciones de flebotomos, siendo uno de los mayores cambios la urbanización del terreno. Los resultados muestran que *P. perniciosus* muestra una menor afinidad por los ambientes urbanos. Un hecho similar se ha observado en el centro de España donde esta especie prefiere zonas agrícolas (Durán-Martínez et al., 2013), aunque en determinadas zonas de Portugal se suele localizar más frecuentemente en ambientes periurbanos (Branco et al., 2013). En Oriente medio, por el contrario, *P. papatasi* y *P. alexandri* suelen estar relacionados con ambientes urbanos (Colacicco-Mayhugh et al., 2010). Por su parte, *P. sergenti* aumenta su riesgo de presencia en zonas con ríos y cursos naturales de agua (8'7 veces mayor que en otros usos), probablemente por las particulares condiciones de humedad de estos ambientes. Se ha observado que en determinadas zonas las larvas de *P. sergenti* proliferan en áreas ricas en agua como canales de drenaje urbanos o de irrigación (Lewis, 1971). Una importante limitación detectada en el uso de esta variable, y que en general puede ser extrapolada a otras variables GIS, es la resolución de los datos, que afecta a la clasificación del terreno y determina la introducción de un sesgo significativo. Esta limitación también ha sido puesta de manifiesto por otros autores (King et al., 2004; Cecchi et al., 2008).



Otra limitación en este tipo de estudios es la dificultad de incluir en el mapa de riesgo variables que no poseen datos con representación espacial, pero que sin embargo tienen un gran interés epidemiológico (King et al., 2004; Cecchi et al., 2008). Este sería el caso de la presencia/ausencia de tubos de PVC en los agujeros de drenaje, presencia/ausencia de vegetación en el muro de contención y cobertura del terreno adyacente. En el caso de la presencia/ausencia de tubos de PVC, se ha observado que la ausencia de PVC aumenta el riesgo de presencia tanto de *P. perniciosus* (5'7 veces mayor) como de *P. sergenti* (5'9 veces mayor). Las otras dos variables han mostrado que *P. sergenti* prefiere ambientes con cultivos de almendros o cítricos, en los que los muros de contención del terreno estén libres de vegetación (riesgo 3'1 y 4'2 veces mayor respectivamente), no teniendo influencia en *P. perniciosus*. Este hecho indica que, la ausencia de tubos de PVC y la presencia de vegetación en los muros de contención, se muestran como factibles medidas de control frente a los flebotomos vectores.

Los muros que presentan PVC en sus agujeros de drenaje son generalmente de más reciente construcción que los típicos muros de contención del terreno, y retienen generalmente menos tierra. Además en su interior habitan un menor número de animales (reptiles, micromamíferos, artrópodos, etc...), lo que limita las potenciales fuentes de alimentación de las hembras adultas, y reduce la presencia de la materia orgánica producida por los residuos de esos animales. Esto provoca, junto con la escasa retención de tierra, que sea imposible el crecimiento de las plantas, por lo que se trata de un ambiente con condiciones desfavorables para la proliferación de las larvas de flebotomo, que necesitan materia orgánica para su desarrollo. De esta manera se ha podido comprobar en los distintos mapas de riesgo generados que, a igualdad del resto de variables, la presencia de tubos de PVC en los muros de contención reduce la probabilidad de encontrar a *P. perniciosus* hasta en un 25'3%, y a *P. sergenti* hasta en un 41,1%. A su vez, se ha observado que la presencia de vegetación en los muros de contención reduce la probabilidad de encontrar a *P.*



sergenti hasta en un 33'4%, lo que demuestra el potencial uso de ambas estrategias como factor de protección frente a estos vectores, y por lo tanto frente a las leishmaniosis que transmiten.

Gracias a los procesos de validación realizados, hemos verificado la utilidad de nuestros modelos de riesgo para predecir la presencia de las especies analizadas de flebotomos vectores. En el caso de *P. perniciosus*, se ha puesto de manifiesto una asociación lineal entre el riesgo de presencia de este vector y la seroprevalencia de leishmaniosis canina. En cuanto a *P. sergenti*, se confirma la utilidad del modelo generado para la detección de zonas de alto riesgo de presencia. Semião-Santos et al. (1995) observaron que *P. sergenti* era la especie de flebotomo predominante en el distrito de Évora. Dicha región del sur de Portugal se encuentra dentro de una zona de alto riesgo en nuestro modelo de riesgo teórico, por lo que se trata de una prueba de su utilidad para la identificación de este tipo de zonas.

Es importante destacar que el mayor riesgo de presencia de *P. sergenti* en el suroeste europeo está concentrado en varias zonas del centro y sur de la Península Ibérica, tal y como se muestra en los mapas de riesgo generados, con valores máximos de entre el 78% y el 93% según el modelo aplicado. Estas zonas de alto riesgo representan lugares en los que el establecimiento de un foco autóctono de *L. tropica* es posible. Cabe mencionar que para que se origine este foco se han de producir una serie de premisas difíciles de predecir. Algunas de éstas son la introducción de la enfermedad a través de personas infectadas procedentes de zonas endémicas, o el hecho de que las poblaciones de *P. sergenti* que se localicen en la región presenten capacidad vectorial. En el caso de la introducción de la enfermedad, es conocido el flujo humano inmigrante proveniente del Norte de África y en menor medida de Oriente Medio, estando demostrada la presencia del parásito en estas regiones (Al-Zaharani et al., 1989; Kimutai et al., 2009; Moncaz et al., 2012; Ajaoud et al., 2013; Akhoundi et al., 2013; Aghaei et al., 2014), y por lo tanto siendo factible el contacto entre el parásito y el vector. Según el Instituto Nacional de Estadística



español (INE), durante el año 2010 un total de 51.235 inmigrantes provenientes del Norte de África y Oriente Medio entraron en España, de los que 43.931 eran marroquíes y 1.212 de Oriente Medio. A estos datos habría que sumar la inmigración ilegal que es bastante frecuente y sobre la cual no se puede ejercer ningún tipo de control sanitario. El 0,2% de los inmigrantes visitados en la Unidad de Referencia de Medicina Tropical en España, desde Abril de 1989 hasta Diciembre de 2007, tenían leishmaniosis cutánea o cutáneo-mucosa (Norman et al., 2010). En España, se ha comprobado que la mayoría de los casos de leishmaniosis cutánea no son declarados (Alvar et al., 2012), y la identificación de las especies involucradas no se suele realizar, por lo tanto la entrada y establecimiento de nuevas especies no está controlado (Gramiccia y Gradoni, 2005). La importación de casos de leishmaniosis cutánea causada por *L. tropica* se ha comprobado en otros países europeos (Grimm et al., 1996; Antinori et al., 2004; Gramiccia y Gradoni, 2005; Morizot et al., 2007). En cuanto al vector, en el presente estudio se ha demostrado la existencia de una línea mitocondrial de *P. sergenti* común entre España y el norte de Marruecos, siendo ésta una zona emergente de *L. tropica*, lo que abre la posibilidad de que las poblaciones de esta especie presentes en España sean capaces de actuar como vectores.

El control de los flebotomos como medida para reducir la transmisión de la leishmaniosis es más eficiente y más aceptado por la sociedad que por ejemplo el sacrificio de perros infectados (Alexander y Maroli, 2003). Recientemente se ha propuesto la vacunación con subolesina/akirina para el control de vectores artrópodos como los flebotomos (Moreno-Cid et al., 2010). Entre los métodos comúnmente empleados para este control, se ha mostrado eficaz la aplicación de insecticidas en casas, refugios de animales, vegetación circundante, y lugares de alimentación y reposo de los flebotomos. Sin embargo, por razones medioambientales no se puede realizar un uso prolongado de estos insecticidas. Es precisamente en este aspecto donde cobran importancia las medidas como el uso de tubos de PVC o la incorporación de vegetación en los muros de contención, ya que se



trata de procesos simples, baratos y no tóxicos que reducen significativamente la presencia de los flebotomos vectores. Dado que este tipo de muros de contención pueden estar localizados cerca de zonas habitadas o lugares de paso, se puede tratar de un efectivo método de control, que unido a otros procedimientos, podrían ayudar a reducir la transmisión de la leishmaniosis. La utilización de mapas de riesgo como herramienta para el control de vectores y de las patologías que estos transmiten también ha sido propuesta para el Dengue (Eisen y Lozano-Fuentes, 2009; Chu et al., 2013), Malaria (Ageep et al., 2009; Govoetchan et al., 2014), Trypanosomiasis africana (Cecchi et al., 2008; Wardrop et al., 2012) y otras enfermedades de transmisión vectorial (Kalluri et al., 2007; Huang et al., 2013).

En resumen, en este estudio hemos podido comprobar que las poblaciones de vectores de *L. tropica* y *L. infantum* presentan una gran diversidad, que es coincidente en su mayor parte con las teorías de dispersión propuestas para todos ellos. A su vez, hemos podido comprobar que *P. sergenti* presenta una línea mitocondrial coincidente entre España y Marruecos, que unido al alto riesgo de presencia observado en los mapas de riesgo, hace que el sur de la Península Ibérica deba considerarse una zona susceptible de sufrir el establecimiento de *L. tropica*. La posible introducción en el suroeste europeo de este parásito, pone de manifiesto que hay que tener un mayor control sobre él, ya que de llegar a producirse, habría que sumar sus casos a los ocasionados por *L. infantum*, que es endémica en la Europa mediterránea y presenta una amplia distribución. Por último, para poder prevenir y controlar los casos de leishmaniosis, se ha mencionado con anterioridad que es más eficiente mediante el control de sus vectores. Por este motivo es importante resaltar el hecho de que, mediante el uso de muros de contención del terreno que posean tubos de PVC en sus agujeros de drenaje y que estén provistos de vegetación, se favorece una reducción significativa de la presencia de flebotomos vectores por lo que se muestran como unas factibles medidas de control de la enfermedad.



5. CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

A través del análisis de los resultados, en el presente estudio se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1- La especie *P. perniciosus* es el principal vector de *L. infantum* en España y presenta una mayor importancia en la epidemiología de la leishmaniosis causada por esta especie debido a que posee una mayor densidad, abundancia y distribución que *P. ariasi*.
- 2- La especie *P. sergenti* es la tercera especie con mayor abundancia en el suroeste español. En determinadas localizaciones, la densidad y abundancia de este vector aumenta significativamente, existiendo en la Península Ibérica áreas en las que la densidad de *P. sergenti* es suficiente para que esta especie tenga importancia vectorial.
- 3- La especie *P. sergenti* presenta una gran diversidad genética, observándose en las poblaciones españolas 1 línea ribosomal con 3 haplotipos y 7 haplotipos mitocondriales separados en 2 líneas; y una línea ribosomal con 3 haplotipos y 10 haplotipos mitocondriales separados en 3 líneas en las poblaciones marroquies.
- 4- Las escasas diferencias entre los haplotipos ribosomales de *P. sergenti*, el hecho de que todos formen parte de una misma línea ribosomal, y la gran variabilidad observada en las secuencias mitocondriales, pone de manifiesto la mayor utilidad del ADN mitocondrial para la realización de los estudios intraespecíficos en los flebotomos.
- 5- La presencia en España de una línea mitocondrial de *P. sergenti* exclusiva española junto con una común con el norte de Marruecos podría tener importantes repercusiones epidemiológicas, dado que la LCA es endémica y/o emergente en el país vecino.
- 6- La especie *P. ariasi* se caracteriza por su amplia diversidad intraespecífica presentando hasta 45 haplotipos mitocondriales distintos que se diferencian



- entre 1-26 bases, y están distribuidos en dos líneas mitocondriales, una de ellas limitada geográficamente a Argelia y la otra distribuida por el resto de países del Mediterráneo.
- 7- Los predictores de presencia de *P. perniciosus* son: altitud, uso del terreno (CORINE) y construcción de los agujeros de drenaje (con o sin tuberías de PVC). Según este modelo, *P. perniciosus* prefiere ambientes no urbanos localizados a una altitud entre 769-1153 m, y cuyos muros de contención no presenten tubos de PVC en sus agujeros de drenaje.
 - 8- Los predictores de presencia de *P. sergenti* son: altitud, uso del terreno (CORINE), temperatura de la superficie terrestre (LST), orientación, cubierta del terreno adyacente, presencia/ausencia de vegetación en el muro de contención y presencia/ausencia de tubos de PVC en los agujeros de drenaje. Según este modelo, *P. sergenti* prefiere ambientes situados entre 0-1153 m de altitud, con temperaturas comprendidas entre 23'3-26'8°C, que estén cerca de ríos o cauces naturales de agua y cultivos de almendros o cítricos, con orientación de 0-159° (N-NO-O-SO), y cuyos muros de contención no presenten ni vegetación en el muro ni tubos de PVC en sus agujeros de drenaje.
 - 9- El mayor riesgo de presencia de *P. sergenti* en el suroeste europeo está concentrado en varias zonas del centro y sur de la Península Ibérica. Ésto junto con el flujo humano inmigrante proveniente del Norte de África y en menor medida de Oriente Medio, y la existencia de una línea mitocondrial de *P. sergenti* común entre España y el norte de Marruecos, hace que el sur de la Península Ibérica sea una zona susceptible de sufrir el establecimiento de *L. tropica*, posibilitando la entrada de esta enfermedad en el suroeste europeo.
 - 10- Los procesos de validación de ambos modelos predictivos han confirmado una correcta determinación de la presencia de los flebotomos vectores mediante su utilización. En el caso de *P. perniciosus*, se ha puesto de manifiesto una asociación lineal entre el riesgo de presencia de este vector y la

seroprevalencia de leishmaniosis canina, mientras que en *P. sergenti*, se ha confirmado la utilidad del modelo generado para la detección de zonas de alto riesgo de presencia (superiores al 11%).

11-La utilización de tubos de PVC para la construcción de sistemas de drenaje en los muros de contención y la presencia de vegetación en los mismos, se muestran como factibles medidas de control frente a los flebotomos vectores, que podrían ayudar a reducir la transmisión de la leishmaniosis.





6. **BIBLIOGRAFÍA**



5. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **Abbas K., Musatafa M.A., Abass S., Kheir M.M., Mukhtar M., Elanim E.M., Elhassan A.M.** 2009. Case Report: Mucosal Leishmaniasis in a Sudanese Patient. *Am J Trop Med Hyg*, 80(6): 935-38.
- ❖ **Abonnenc E.** 1972. Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae) (8ª Ed). Éditions de L'office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-mer. France.
- ❖ **Acedo-Sánchez C., Martín-Sánchez J., Vélez-Bernal I.D., Sanchís-Marín M.C., Louassini M., Maldonado J.A., Morillas-Márquez F.** 1996. Leishmaniasis Ecoepidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, southern Spain). *Int J Parasitol*, 25(3): 303-10.
- ❖ **Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., Mccourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R.** 2005. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*, 52(5): 399-451.
- ❖ **Afonso M.O., Campino L., Cortes S., Alves-Pires C.** 2005. The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII--Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida leishmaniasis focus. *Parasite*, 12(1): 69-72.
- ❖ **Ageep T.B., Cox J., Hassan M.M., Knols B.G., Benedict M.Q., Malcolm C.A., Babiker A., El Sayed B.B.** 2009. Spatial and temporal distribution of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in northern Sudan: influence of environmental factors and implications for vector control. *Malar J*, 8(1): 123.
- ❖ **Aghaei A.A., Rassi Y., Sharifi I., Vatandoost H., Mollaie H., Oshaghi M.A., Abai M., Rafizadeh S.** 2014. First report on natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus sergenti* due *Leishmania tropica* by high resolution melting curve method in South-



eastern Iran. *Asian Pac J Trop Med*, 7(2): 93-6.

- ❖ **Aghaei S., Salmanpour R., Handjani F., Monabati A., Mazharinia N., Dastgheib L.** 2004. Ulcerated disseminated cutaneous leishmaniasis associated with vitiligo, hypothyroidism, and diabetes mellitus in a patient with Down syndrome. *Dermatol Online J*, 10(2): 21.
- ❖ **Ajaoud M., Es-sette N., Hamdi S., El-Idrissi A.L., Riyad M., Lemrani M.** 2013. Detection and molecular typing of *Leishmania tropica* from *Phlebotomus sergenti* and lesions of cutaneous leishmaniasis in an emerging focus of Morocco. *Parasit Vectors*, 6(1): 217.
- ❖ **Akhoundi M., Baghaei A., Depaquit J., Parvizi P.** 2013. Molecular characterization of *Leishmania* infection from naturally infected sand flies caught in a focus of cutaneous leishmaniasis (eastern Iran). *J Arthropod Borne Dis*, 7(2): 122-31.
- ❖ **Alarcón-Elbal P.M., Montoliu B.G., Pinal R., Delacour-Estrella S., Ruiz-Arrondo I., Peribáñez M.A., De Blas I., Molina R., Castillo J.A., Diéguez-Fernández L., Lucientes J.** 2011. How to increase the population of a *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) colony: a new method. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(6): 731-4.
- ❖ **Alavi-Naini R., Fazaeli A., O'Dempsey T.** 2012. Topical Treatment Modalities for Old World Cutaneous Leishmaniasis: A Review. *Prague Med Rep*, 113(2): 105-18.
- ❖ **Alborzi A., Pouladfar G.R., Fakhar M., Motazedian M.H., Hatam G.R., Kadivar M.R.** 2008. Isolation of *Leishmania tropica* from a patient with visceral leishmaniasis and disseminated cutaneous leishmaniasis, southern Iran. *Am J Trop Med Hyg*, 79(3): 435-7.
- ❖ **Alcalde-Alonso M.M.** 1988. Aproximación al estudio epidemiológico, clínico y terapéutico de las leishmaniasis cutáneas en la provincia de Granada. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- ❖ **Alcalde-Alonso M., Morillas-Márquez F., Delgado-Florencio V., Naranjo-Sintes R.** 1989. Epidemiología de las leishmaniasis cutáneas en la provincia de Granada. *Actas Dermo-Sif*, 80(4): 251-4.

- ❖ **Alcover M.M., Gramiccia M., Di Muccio T., Ballart C., Castillejo S., Picado A., Portús M., Gállego M.** 2012. Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniosis. *Parasitol Res*, 111(2): 515-23.
- ❖ **Alexander B., Maroli M.** 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*, 17(1): 1-18.
- ❖ **Alexander J., Satoskar A.R., Russell D.G.** 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*, 112(18): 2993-3002.
- ❖ **Aliaga L., Cobo F., Diego-Mediavilla J., Bravo J., Osuna A., Amador J.M., Martín-Sánchez J., Cordero E., Navarro J.M.** 2003. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*. Clinical and microbiological findings in 31 patients. *Medicine*, 82(3): 147-58.
- ❖ **Al-Qubati Y., Janniger E.J., Schwartz R.A.** 2012. Cutaneous leishmaniasis: cryosurgery using carbón dioxide slush in a resource-poor country. *Int J Dermatol*, 51(10): 1217-20.
- ❖ **Alvar J., Cañavate C., Gutiérrez-Solar B., Jiménez M., Laguna F., López-Vélez R., Molina R., Moreno J.** 1997. *Leishmania* and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 10(2): 298-319.
- ❖ **Alvar J., Cañavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J.** 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 57: 1-88.
- ❖ **Alvar J., Vélez I.D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., den Boer M.; WHO Leishmaniosis Control Team.** 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5): e35671.
- ❖ **Alves-Pires C.** 1984. *Phlebotomus* of Portugal. I. Natural infestation of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 and *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania* in the zoonotic focus of Arrábida (Portugal). *Ann Parasitol Hum Comp*, 59(5): 521-4.
- ❖ **Al-Zahrani M.A., Peters W., Evans P.A., Ching-Chin I., Smith V., Lane R.P.** 1988.



Phlebotomus sergenti, a vector of *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. Trans R Soc Trop Med Hyg, 82(3): 416.

- ❖ **Al-Zahrani M.A., Peters W., Evans P.A., Smith V., Ching-Chin I.** 1989. *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 6. Cutaneous leishmaniasis of man in the south-west. Trans R Soc Trop Med Hyg, 83(5): 621-8.
- ❖ **Amelotti I., Catalá S.S., Gorla D.E.** 2009. Experimental evaluation of insecticidal paints against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), under natural climatic conditions. Parasit Vectors, 2(1): 30.
- ❖ **Amro A., Gashout A., Al-Dwibe H., Zahangir Alam M., Annajar B., Hamarsheh O., Shubar H., Schönián G.** 2012. First molecular epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Libya. PLoS Negl Trop Dis, 6(6): e1700.
- ❖ **Amusategui I., Sainz A., Aguirre E., Tesouro M.A.** 2004. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in Northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. Ann N Y Acad Sci, 1026(1): 154-7.
- ❖ **Antinori S., Gianelli E., Calattini S., Longhi E., Gramiccia M., Corbellino M.** 2005. Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travelers. Clin Microbiol Infect, 11(5): 343-6.
- ❖ **Aransay A.M., Ready P.D., Morillas-Márquez F.** 2003. Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. Heredity, 90(4): 316-25.
- ❖ **Aransay A.M., Testa J.M., Morillas-Márquez F., Lucientes J., Ready P.D.** 2004. Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. Parasitol Res, 94(6): 416-20.
- ❖ **Arnedo M.A.** 1999. Cladismo: La reconstrucción Filogenética basada en Parsimonia. Evolución y Filogenia de Arthropoda - Bol SEA, 26: 57-84.
- ❖ **Arnedo Peña A., Bellido Blasco J.B., González Morán F., Arias Sánchez A., Calvo Más C., Safont Aduara L., Fabra Peirat E., Criado Juarez J., Pons Roig P.** 1994. Leishmaniosis en Castellón: un estudio epidemiológico de casos humanos, el vector y el reservorio canino. Rev Sanid Hig Publica, 68(4): 481-91.

- ❖ **Aronson N.E., Wortmann G.W., Byrne W.R., Howard R.S., Bernstein W.B., Marovich M.A., Polhemus M.E., Yoon I.K., Hummer K.A., Gasser R.A.Jr., Oster C.N., Benson P.M.** 2010. A randomized controlled trial of focal heat therapy versus intravenous sodium stibogluconate for the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection. PLoS Negl Trop Dis, 4(3): e628.
- ❖ **Arrivillaga J.C., Norris D.E., Feliciangeli M.D., Lanzaro G.C.** 2002. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. Infect Gen Evol, 2(2): 83-95.
- ❖ **Ashford R.W.** 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol, 30(12): 1269-81.
- ❖ **Aspöck H.** 2008. Postglacial formation and fluctuations of the diversity of Central Europe in the light of climate change. Parasitol Res, 103(1): S7-S10.
- ❖ **Aspöck H., Gerersdorfer T., Formayer H., Walochnik, J.** 2008. Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. Wien Klin Wochenschr, 120(4): 24-9.
- ❖ **Attar Z.J., Chance M.L., el-Safi S., Carney J., Azazy A., El-Hadi M., Dourado C., Hommel M.** 2001. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. Acta Trop, 78(1): 11-6.
- ❖ **Bailey M.S., Lockwood D.N.** 2007. Cutaneous Leishmaniasis. Clin Dermatol, 25(2): 203-11.
- ❖ **Balaña-Fouce R., Reguera R.M., Cubría J.C., Ordóñez D.** 1998. The Pharmacology of Leishmaniasis. Gen Pharmac, 30(4): 435-43.
- ❖ **Ballart C., Barón S., Alcover M.M., Portus M., Gállego M.** 2012. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: first finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. Acta Trop, 122(1): 155-9.
- ❖ **Ballart C., Guerrero I., Castells X., Barón S., Castillejo S., Alcover M.M., Portus M., Gállego M.** 2014. Importance of individual analysis of environmental and climatic factors affecting the density of *Leishmania* vectors living in the same geographical area: the example of *Phlebotomus ariasi* and *Phlebotomus perniciosus* in northeast



Spain. Geospat Health, (article in press).

- ❖ **Baltà-Cruz S., Alsina-Gibert M., Mozos-Rocafort A., Cervera C., Colomo-Saperas Ll., Del Rio A., Estrach-Panella T.** 2009. Pseudolymphomatoid Cutaneous Leishmaniasis in a Patient Treated with Adalimumab for Rheumatoid Arthritis. *Acta Derm Venereol*, 89(4): 432-3.
- ❖ **Baneth G., Aroch I.** 2008. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet J*, 175(1): 14-5.
- ❖ **Baneth G., Koutinas A.F., Solano-Gallego L., Bourdeau P., Ferrer L.** 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, 24(7): 324-30.
- ❖ **Bañuls A-L., Hide M., Prugnolle F.** 2007. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Adv Parasitol*, 64: 1-458.
- ❖ **Bates P.A.** 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37 (10): 1097-106.
- ❖ **Bejarano E.E., Sierra D., Vélez I.D.** 2003. Novedades en la distribución geográfica del grupo *verrucatum* (Diptera: Psychodidae) en Colombia. *Biomedica*, 23(3): 341-50.
- ❖ **Belen A., Kucukyildirim S., Alten B.** 2011. Genetic structures of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a leishmaniasis endemic region of Turkey. *J Vector Ecol*, 36(Suppl 1): S32-48.
- ❖ **Bell A.S., Ranford-Cartwright L.C.** 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol*, 18(8): 337-42.
- ❖ **Berberian DA.** 1938. Succesful transmission of cutaneous leishmaniasis by the bite of *Stomoxys calcitrans*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 38(2): 254-6.
- ❖ **Berdjane-Brouk Z., Koné A.K., Djimdé A.A., Charrel R.N., Ravel C., Delaunay P., del Giudice P., Diarra A.Z., Doumbo S., Goita S., Thera M.A., Depaquit J., Marty P., Doumbo O.K., Izri, A.** 2012. First Detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaemyia) darlingi* from Cutaneous Leishmaniasis Foci in Mali.

PLoS One, 7(1): e28266.

- ❖ **Bergquist N.R.** 2001. Vector-borne parasitic diseases: new trends in data collection and risk assessment. *Acta Trop*, 79(1): 13-20.
- ❖ **Berman J.D.** 1997. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clin Infect Dis*, 24(4): 684-703.
- ❖ **Besteiro S., Williams R.A., Coombs G.H., Mottram J.C.** 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, 37(10): 1063-75.
- ❖ **Bhunias G.S., Kesari S., Jeyaram A., Kumar V., Das P.** 2010. Influence of topography on the endemicity of Kala-azar : a study based on remote sensing and geographical information system. *Geospat Health*, 4(2): 155-65.
- ❖ **Bogdan C., Schöniat G., Bañuls A.L., Hide M., Pratlong F., Lorenz E., Röllinghoff M., Mertens R.** 2001. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis*, 32(2): 302-6.
- ❖ **Bonfante-Garrido R., Meléndez E., Barroeta S., de Alejos M.A., Momen H., Cupolillo E., McMahon-Pratt D., Grimaldi G.Jr.** 1992. Cutaneous leishmaniasis in western Venezuela caused by infection with *Leishmania venezuelensis* and *L. braziliensis* variants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86(2): 141-8.
- ❖ **Botet Fregola J., Portus Vinyeta M.** 1993. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). *Rev San Hig Púb*, 67 (4): 255-66.
- ❖ **Boussaa S., Pesson B., Boumezzough A.** 2009. Faunistic study of the sandflies (Diptera: Psychodidae) in an emerging focus of cutaneous leishmaniasis in Al Haouz province, Morocco. *Ann Trop Med Parasitol*, 103(1): 73-83.
- ❖ **Bousslimi N., Aoun K., Ben-Abda I., Ben-Alaya-Bouafif N., Raouane M., Bouratbine A.** 2010. Epidemiologic and clinical features of cutaneous leishmaniasis in southeastern Tunisia. *Am J Trop Med Hyg*, 83(5): 1034-9.
- ❖ **Branco S., Alves-Pires C., Maia C., Cortes S., Cristovão J.M., Gonçalves L., Campino L., Afonso M.O.** 2013. Entomological and ecological studies in a new



potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Trop*, 125(3): 339-48.

- ❖ **Bualert L., Charungkiattikul W., Thongsuksai P., Mungthin M., Siripattanapipong S., Khositnithikul R., Naaglor T., Ravel C., El Baidouri F., Leelayoova S.** 2012. Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. *Am J Trop Med Hyg*, 86(5): 821-4.
- ❖ **Cabral M., O'Grady J., Alexander J.** 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol*, 14(5): 531-9.
- ❖ **Campino L., Cortes S., Dionísio L., Neto L., Afonso M.O., Maia C.** 2013. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(4): 516-8.
- ❖ **Campino L., Pratlong F., Abranches P., Rioux J.A., Santos-Gomes G., Alves-Pires C., Cortes S., Ramada J., Cristovao J.M., Afonso M.O., Dedet, J.P.** 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health*, 11(11): 1708-14.
- ❖ **Casolari C., Guaraldi G., Pecorari M., Tamassia G., Cappi C., Fabio G., Cesinero A.M., Piolini R., Rumpianesi F., Presutti L.** 2005. A rare case of localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in an immunocompetent Italian host. *Eur J Epidemiol*, 20(6): 559-61.
- ❖ **Castillo-Salgado C.** 2003. Sistemas de Información Geográfica en Salud: Conceptos Básicos. En: PAHO. Washington DC. Estados Unidos de América.
- ❖ **Cavalier-Smith T.** 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev*, 73(3): 203-66.
- ❖ **Cecchi G., Mattioli R.C., Slingenbergh J., de la Rocque, S.** 2008. Land cover and tsetse fly distributions in sub-Saharan Africa. *Med Vet Entomol*, 22(4): 364-73.
- ❖ **Chamaillé L., Tran A., Meunier A., Bourdoiseau G., Ready P., Dedet J.P.** 2010. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasit Vectors*,

3(31): 5.

- ❖ **Chang A.Y., Parrales M.E., Jimenez J., Sobieszczyk M.E., Hammer S.M., Copenhaver D.J., Kulkarni R.P.** 2009. Combining Google Earth and GIS mapping technologies in a dengue surveillance system for developing countries. *Int J Health Geogr* 8(1): 49.
- ❖ **Charrel R.N., Izri A., Temmam S., de Lamballerie X., Parola P.** 2006. Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* flies. *Emerg Infect Dis*, 12(8): 1299-300.
- ❖ **Chicharro C., Jiménez M.I., Alvar J.** 2003. Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Ann Trop Med Parasitol*, 97(Suppl 1): 57-64.
- ❖ **Chitimia L., Muñoz-García C.I., 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 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 dog in southeastern Spain. *Vet Parasitol*, 181(1): 12-6.
- ❖ **Chu H.J., Chan T.C., Jao F.J.** 2013. GIS-aided planning of insecticide spraying to control dengue transmission. *Int J Health Geogr*, 12(1): 42.
- ❖ **Claborn D., Masuoka P., Morrow M., Keep L.** 2008. Habitat analysis of North American sandflies near veterans returning from *Leishmania*-endemic war zones. *Int J Health Geogr*, 7: 65.
- ❖ **Colaccico-Mayhugh M.G., Masuoka P.M., Grieco J.P.** 2010. Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Middle East. *Int J Health Geogr*, 9: 2.
- ❖ **Colmenares M., Constant S.L., Kima P.E., McMahon-Pratt D.** 2002. *Leishmania pifanoi* pathogenesis: selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. *Infect Immun*, 70(12): 6597-605.
- ❖ **Colombo F.A., Odorizzi R.M., Laurenti M.D., Galati E.A., Canavez F., Pereira-Chioccia V.L.** 2011. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas



and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res*, 109(2): 267-74.

- ❖ **Conesa-Gallego E., Romera-Lozano E., Martínez-Ortega E.** 1997. Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera: Psychodidae) de la comunidad de Madrid (España). *An Biol*, 22(Biología animal, 11): 43-50.
- ❖ **Contreras M.A.** 2009. Taxonomía, biología y morfología de Flebotomíneos: 1-12. En: Manual para el estudio e identificación de vectores de leishmaniosis. Curso Latinoamericano de estudio e identificación de vectores de leishmaniasis. Medellín. Colombia.
- ❖ **Corrales Padilla H., Laínez H.** 1968. Leishmaniosis Cutánea Diseminada (Revisión del tema e informe del primer caso en Honduras). *Rev Med Hondur*, 36: 142-8.
- ❖ **Costa M.A., Matheson C., Iachetta L., Llagostera A., Appenzeller O.** 2009. Ancient Leishmaniasis in a Highland desert of Northern Chile. *PLoS One*, 4(9): e6983.
- ❖ **Cox F.E.G.** 2002. Systematics of the parasitic Protozoa. *Trends Parasitol*, 18(3): 108.
- ❖ **Croset H., Rioux J.A., Jumier B., Tour S.** 1970. Fluctuations annuelles des populations de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, *Phlebotomus perfiliewi* Parrot, 1930 et *Sergentomyia minuta parroti* (Adler et Theodor, 1927) (Diptera, Psychodidae) en Tunisie du Nord. *Arch Inst Pasteur Tunis*, 47(1/2): 43-56.
- ❖ **Cross E.R., Hyams K.C.** 1996. The potential effect of Global Warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in Southwest Asia. *Envir Health Persp*, 104(7): 724-7.
- ❖ **Czerny L., Strobl G.** 1909. Spanische Dipteren III. Beitrag. Verhandlungen der zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien, 59: 121-301.
- ❖ **D'Urso V., Ruta F., Khoury C., Bianchi R., Depaquit J., Maroli M.** 2004. About the presence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae) in Eastern Sicily, Italy. *Parasite*, 11(3): 279-83.
- ❖ **Dastàlová A., Volf P.** 2012. *Leishmania* development in sandflies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*, 5: 276.
- ❖ **Daudén E., García C., Zarco C., López S., Iglesias L.** 1990. Leishmaniasis cutánea en el foco endémico de Madrid. Estudio de 31 casos. *Actas Dermo-Sif* 1990; 81(6):

395-404.

- ❖ **Davidson I.H.** 1990. Sand Flies of Africa South of the Sahara: Taxonomy and Systematics of the Genus *Sergentomyia*. South African Institute for Medical Research, Johannesburg.
- ❖ **Davidson R.N.** 1998. Practical Guide for the Treatment of Leishmaniosis. *Drugs*, 56(6): 1009-18.
- ❖ **Davis N.T.** 1967. Leishmaniasis in the Sudan republic. 28. Anatomical studies on *Phlebotomus orientalis* Parrot and *P. papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 4(1): 50-65.
- ❖ **de La Rocque S., Rioux J.A.** 2008. Impact of climate change on the epidemiology of diseases. *Bull Soc Pathol Exot*, 101(3): 213-9.
- ❖ **de La Rocque S., Rioux J.A., Slingenbergh J.** 2008. Climate change: effects on animal disease systems and implications for surveillance control. *Rev Sci Tech*, 27(2): 339-54.
- ❖ **Del Olmo Martínez L., Aller de la Fuente R., Velayos Jiménez B., Fernández Salazar L., González Hernández J.M.** 2009. Leishmaniasis visceral diagnosticada por biopsia duodenal. *Rev Esp Enferm Dig*, 101(6): 439-40.
- ❖ **de-Meeûs T., Renaud F.** 2002. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends Parasitol*, 18(6): 247-51.
- ❖ **Depaquit J., Bounamous A., Akhoundi M., Augot D., Sauvage F., Dvorak V., Chaibullinova A., Pesson B., Volf P., Léger N.** 2013. A taxonomic study of *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi* s. l. *Infect Genet Evol*, 20: 500-8.
- ❖ **Depaquit J., Ferté H., Léger N., Killick-Kendrick R., Rioux J.A., Killick-Kendrick M., Hanafi H.A., Gobert S.** 2000. Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. *Insect Mol Biol*, 9(3): 293-300.
- ❖ **Depaquit J., Ferté H., Léger N., Lefranc F., Alves-Pires C., Hanafi H., Maroli M., Morillas-Márquez F., Rioux J.A., Svobodova M., Volf P.** 2002. ITS 2 sequences



heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. Int J Parasitol, 32(9): 1123-31.

- ❖ **Depaquit J., Grandadam M., Fouque F., Andry P.E., Peyrefitte C.** 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. Euro Surveill, 15(10): 19507.
- ❖ **Depaquit J., Lienard E., Verzeaux-Griffon A., Ferté H., Bounamous A., Gantier J.C., Hanafi H.A., Jacobson R.L., Maroli M., Moin-Vaziri V., Müller F., Ozbel Y., Svobodova M., Volf P., Léger N.** 2008. Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA Epidemiological consequences. Infect Genet Evol, 8(2): 159-70.
- ❖ **Depaquit J., Naucke T.J., Schmitt C., Ferté H., Léger N.** 2005. A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (*Phlebotomus*, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. Parasitol Res, 95(2): 113-6.
- ❖ **Dereure J., Rioux J.A., Gállego M., Perières J., Pratlong F., Mahjour J., Saddiki, H.** (1991). *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. Trans R Soc Trop Med Hyg, 85(5): 595.
- ❖ **Desjeux P.** 1996. Leishmaniasis: Public health aspects and control. Clin Dermatol, 14(5): 417-23.
- ❖ **Desjeux P., Alvar J.** 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol, 97(1): 3-15.
- ❖ **Di Muccio T., Marinucci M., Frusteri L., Maroli M., Pesson B., Gramiccia M.** 2000. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larroussius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. Insect Biochem Mol Biol, 30(5): 387-93.
- ❖ **Dolmatova A.V., Demina N.A.** 1971. Les phlébotomes (*Phlebotominae*) et les maladies qu'ils transmettent. En: Cap. 6. Étude anatomique et physiologique des

Phlebotominae ailés. Éditions Off Rech Sci Tech Outre-Mer. pp. 89-95.

- ❖ **Dujardin J.C., Campino L., Cañavate C., Dedet J.P., Gradoni L., Soteriadou K., Mazeris A., Ozbek Y., Boelaert M.** 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14(7): 1013-8.
- ❖ **Durán-Martínez M., Ferroglio E., Acevedo P., Trisciuglio A., Zanet S., Gortázar C., Ruiz-Fons F.** 2013. *Leishmania infantum* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) Phlebotomine Sand Fly Vectors in Continental Mediterranean Spain. *Environ Entomol*, 42(6): 1157-65.
- ❖ **Dvorak V., Aytekin A.M., Alten B., Skarupova S., Votypka J., Volf P.** 2006. A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). *J Vector Ecol*, 31(2): 229-38.
- ❖ **Dvorak V., Votypka J., Aytekin A.M., Alten B., Volf P.** 2011. Intraespecific variability of natural populations of *Phlebotomus sergenti*, the main vector of *Leishmania tropica*. *J Vector Ecol*, 36(Suppl.1): S49-57.
- ❖ **Eisen L., Lozano-Fuentes S.** 2009. Use of Mapping and Spatial and Space-Time Modeling Approaches in Operational Control of *Aedes aegypti* and Dengue. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(4): e411.
- ❖ **El-Badry A., Al-Juhani A., Ibrahim el-K., Al-Zubiany S.** 2008. Distribution of sand flies in El-Nekheil province, in Al-Madinah Al-Munawwarah region, western of Saudi Arabia. *Parasitol Res*, 103(1): 151-6.
- ❖ **Elnaiem D.A., Schorscher J., Bendall A., Obsomer V., Osman M.A., Mekkawi A.M., Connor S.J., Ashford R.W., Thomson M.C.** 2003. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern Sudan. *Am J Trop Med Hyg*, 68(1): 10-17.
- ❖ **Enserink M.** 2000. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.?. *Science*, 290(5498): 1881-3.
- ❖ **Esseghir S., Ready P.D.** 2000. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larrousius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. *Biol J Linn Soc*, 70(2): 189-219.



- ❖ **Esseghir S., Ready P.D., Killick-Kendrick R., Ben-Ismaïl R.** 1997. Mitochondrial haplotypes and geographical vicariance of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Mol Biol*, 6(3): 211-25.
- ❖ **Evans D., Godfrey D., Lanham S., Lanotte G., Modabber F., Schnur L.** 1989. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of *Leishmania*. En: WHO (Ed). Geneva. Switzerland. pp. 28–32.
- ❖ **Faber W.R., Hoekzema R., Bart A., Zeeglar J.E., de Vries H.J.** 2012. Cutaneous leishmaniasis in Jura, France. *Emerg Infect Dis*, 18(1): 183-4.
- ❖ **Faucher B., Pomares C., Fourcade S., Benyamine A., Marty P., Pratlong L., Faraut F., Mary C., Piarroux R., Dedet J.P., Pratlong F.** 2011. Mucosal *Leishmania infantum* leishmaniasis: specific pattern in a multicentre survey and historical cases. *J Infect*, 63(1): 76-82.
- ❖ **Fernández-Bellón H., Solano-Gallego L., Rodríguez-Cortés A., Ferrer L., Gallego M., Alberola J., Ramis A.** 2008. Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain. *Vet Parasitol*, 155(1): 32-6.
- ❖ **Fernández Martínez F., Camacho Alexandre F.** 1913. Kala-azar infantil en las costas granadinas. *Actual Med*, 3: 82-93.
- ❖ **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(2): 87-97.
- ❖ **Fischer D., Moeller P., Thomas S.M., Naucke T.J., Beierkuhnlein C.** 2011. Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS Neglect Trop Dis*, 5(1): e1407.
- ❖ **Fischer D., Stephanie M.T., Beierkuhnlein C.** 2010. Temperature-derived potential for the establishment of phlebotomine sandflies and visceral leishmaniasis in Germany. *Geosp Health*, 5(1): 59-69.
- ❖ **Franco A.O., Davies C.R., Mylne A., Dedet J.P., Gállego M., Ballart C., Gramiccia M., Gradoni L., Molina R., Gálvez R., Morillas-Márquez F., Barón-López S., Pires**

- C.A., Afonso M.O., Ready P.D., Cox J.** 2011. Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology*, 138(14): 1878-91.
- ❖ **Frézard F., Demicheli C., Ribeiro R.R.** 2009. Pentavalent antimonials: News perspectives for old drugs. *Molecules*, 14(7): 2317-36.
- ❖ **Gajapathy K., Peiris L.B., Goodacre S.L., Silva A., Jude P.J., Surendran S.N.** 2013. Molecular identification of potential leishmaniasis vector species within the *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes* species complex in Sri Lanka. *Parasit Vectors*, 6(1): 302.
- ❖ **Gállego-Berenguer J.** 2006. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Universitat de Barcelona (Ed). Barcelona. España.
- ❖ **Gállego-Berenguer J., Botet-Fregola J., Gállego-Culleré M., Portús-Vinyeta M.** 1992. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Información sobre los métodos de captura. En: "In memoriam" al Profesor Doctor D.F. de P. Martínez Gómez (58). pp. 579-600.
- ❖ **Gállego M.** 2004. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Sci Tech Rev Off Int Epiz*, 23(2): 661-76.
- ❖ **Gállego M., Pratlong F., Riera C., Muñoz C., Ribera E., Fisa R., Rioux J.A., Dedet J.P., Portús M.** 2002. Isoenzymatic identification of *Leishmania* isolates from repeated clinical human leishmaniasis episodes in Catalonia (Spain). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(1): 45-7.
- ❖ **Gállego M., Riera C.** 2000. Las leishmaniosis humanas: leishmaniosis autóctona por *Leishmania infantum*. Control Calidad SEIMC (Ed) Unitat de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona.
- ❖ **Gálvez R., Descalzo M.A., Guerrero I., Miró G., Molina R.** 2011. Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector in the Madrid region (Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11(7): 799-806.



- ❖ **Gálvez R., Descalzo M.A., Miró G., Jiménez M.I., Martín O., Dos-Santos-Brandao F., Guerrero I., Cubero E. y Molina R.** 2010a. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop*, 115(1): 95-102.
- ❖ **Gálvez R., Miró G., Descalzo M.A., Nieto J., Dado D., Martín O., Cubero E. y Molina R.** 2010b. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol*, 169(3): 327-34.
- ❖ **Gangneux J.P., Sauzet S., Donnard S., Meyer N., Cornillet A., Pratlong F., Guiguen C.** 2007. Recurrent American cutaneous leishmaniasis. *Emerg Infect Dis* 13(9): 1436-8.
- ❖ **García-Almagro D.** 2004. Leishmaniosis cutánea: Estudio en el área sanitaria de Toledo. Tesis Doctoral. Universidad complutense de Madrid, Madrid.
- ❖ **García-Almagro D.** 2005. Leishmaniosis cutánea. *Act Dermo-Sifiliogr*, 96(1): 1-24.
- ❖ **Gebre-Michael T., Balkew M., Ali A., Ludovisi A., Gramiccia M.** The isolation of *Leishmania tropica* and *L. aethiopica* from *Phlebotomus (Paraphlebotomus)* species (Diptera: Psychodidae) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98(1): 64-70.
- ❖ **Gil-Collado J., Morillas-Márquez F., Sanchís-Marín M.C.** 1989. Los flebotomos en España. *Rev San Hig Púb*, 63: 15-34.
- ❖ **Gil-Prieto R., Walter S., Alvar J., Gil-de-Miguel A.** 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on Hospitalization records (1997-2008). *Am J Trop Med Hyg*, 85(5): 820-5.
- ❖ **Githeko A.K., Lindsay S.W., Confalonieri U.E., Patz J.A.** 2000. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the world Health Organization*, 78(9): 1136-47.
- ❖ **Gomes Y.M., Cavalcanti M.P., Lira R.A., Abath F.G.C., Alves L.C.** 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J*, 175(1): 45-52.
- ❖ **Gómez-Ochoa P., Castillo J.A., Gascón M., Zarate J.J., Alvarez F., Couto C.G.** 2009. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical

trial. Vet J, 179(2): 259-63.

- ❖ **Gómez-Ochoa P., Sabate D., Homedes J., Ferrer L.** 2012. Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for the evaluation of Domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs. Vet Immunol Immunopathol, 146(1): 97-9.
- ❖ **González C., Wang O., Strutz S.E., González-Salazar C., Sánchez-Cordero V., Sarkar S..** 2010. Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. PLoS Negl Trop Dis, 4(1): e585.
- ❖ **González L.M., Vélez I.D.** 2006. Tratamiento con miltefosina de la leishmaniosis cutánea diseminada. Biomédica, 26(1): 13-6.
- ❖ **Govoetchan R., Gnanguènon V., Ogouwalé E., Oké-Agbo F., Azondékon R., Sovi A., Attolou R., Badirou K., Youssouf R.A., Ossè R., Akogbéto M.** 2014. Dry season refugia for anopheline larvae and mapping of the seasonal distribution in mosquito larval habitats in Kandi, northeastern Benin. Parasit Vectors, 7(1): 137.
- ❖ **Gramiccia M., Gradoni L.** 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol, 35(11): 1169-80.
- ❖ **Grimm F., Gessler M., Brun R.** 1996. Isolation and characterization of *Leishmania* parasites imported into Switzerland – a retrospective study. Parasitol Res, 82(6): 563-5.
- ❖ **Grové S.S.** 1989. Leishmaniasis in south west Africa/Namibia to date. S Afr Med J, 75(6): 290-2.
- ❖ **Guerbouj S., Chemkhi J., Kaabi B., Rahali A., Ben Ismail R., Guizani I.** 2007. Natural infection of *Phlebotomus (Larroussius) langeroni* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania infantum* in Tunisia. R Soc Trop Med Hyg, 101(4): 372-7.
- ❖ **Guernaoui S., Boumezzough A., Laamrani A.** 2006. Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. Acta Trop, 97(3): 346-51.
- ❖ **Guernaoui S., Pesson B., Boumezzough A., Pichon G.** 2005. Distribution of phlebotomine sandflies, of the subgenus *Larroussius*. Morocco Med Vet Entomol,



19(1): 111-15.

- ❖ **Guessous-Idrissi N., Madani A., Rhalem A., Riyad M., Sahibi H., Dehbi F., Bichichi M., Essari A., Berrag B.** 1997a. Epidemiology of human visceral leishmaniasis in Taounate, a northern province of Morocco. *Parasite*, 4(2): 181-5.
- ❖ **Guessous-Idrissi N., Chiheb S., Hamdani A., Riyad M., Bichichi M., Hamdani S., Krimech A.** 1997b. Cutaneous leishmaniasis: an emerging epidemic focus of *leishmania tropica* in northern Morocco. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91(6): 660-3.
- ❖ **Guevara-Benítez D., Úbeda-Ontiveros J.M., Morillas-Márquez F.** 1978. *Phlebotominae* en la provincia de Granada: estudio de poblaciones. *Rev Ibér Parasitol*, 38(3-4): 813-39.
- ❖ **Guilvard E., Gállego M., Moreno G., Fisa R., Rispaill P., Pratlong F., Martínez-Ortega E., Gállego J., Rioux J.A.** 1996. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne). *Parasite*, 3: 191-2.
- ❖ **Guilvard E., Rioux J.A., Gállego M., Pratlong F., Mahjour J., Martinez-Ortega E., Dereure J., Saddiki A., Martini A.** 1991. *Leishmania tropica* au Maroc. III. Rôle vecteur de *Phlebotomus sergenti*. *Ann Parasitol Hum Comp*, 66(3): 96-9.
- ❖ **Gupta N., Goyal N., Rastogi A.K.** 2001. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol*, 17(3): 150-3.
- ❖ **Hamarsheh O., Presber W., Abdeen Z., Sawalha S., Al-Lahem A., Schönián G.** 2007. Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. *Med Vet Entomol*, 21(3): 270-7.
- ❖ **Hanafi H.A., El-Din el-S.M., El-Hossary S.S., Kaldas R.M., Villinski J.T., Furman B.D., Fryauff D.J.** 2013. Experimental acquisition, development, and transmission of *Leishmania tropica* by *Phlebotomus duboscqi*. *Acta Trop*, 125(1): 37-42.
- ❖ **Hernández C.A.** 2006. Natural history of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Biomédica*, 26(Suppl 1): 10-2.

- ❖ **Hernández-Rodríguez S., Martínez-Moreno A.** 1992. Leishmaniosis canina. En: Sanmartín-Durán M.L. (Ed) Avances en Parasitología: Protozoología. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. pp. 93-120.
- ❖ **Herwaldt B.L.** 1999. Leishmaniasis. Lancet, 354(9185): 1191-9.
- ❖ **Hillis D.M., Allard M.W., Miyamoto M.M.** 1992. Analysis of DNA sequence data: phylogenetic inference. Methods Enzymol, 224: 456-87.
- ❖ **Hotez P.J., Savioli L., Fenwick A.** 2012. Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, and opportunities for control. PLoS Negl Trop Dis, 6(2): e1475.
- ❖ **Huang Z., Wu X., Garcia A.J., Fik T.J., Tatem A.J.** 2013. An open-access modeled passenger flow matrix for the global air network in 2010. PLoS One, 8(5): e64317.
- ❖ **Huelsenbeck J.P., Crandall K.A.** 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using Maximum Likelihood. Annu Rev Ecol Syst, 28(1): 437-66.
- ❖ **Iniesta L., Fernández-Barredo S., Bulle B., Gómez M.T., Piarroux R., Gállego M., Alunda J.M., Portús M.** 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. Clin Diagnostic Laborat Immunol, 9(5): 1137-41.
- ❖ **Izri M.A., Marty P., Rahal A., Lelièvre A., Ozon C., Baldelli G., Presiozo J., Haas P., Le Fichoux Y.** 1991. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 naturally infected by promastigotes in the región of Nice (France). Bull Soc Pathol Exot, 85(5): 385-7.
- ❖ **Jaouadi K., Haouas N., Chaara D., Boudabous R., Gorcii M., Kidar A., Depaquit J., Pratlong F., Dedet J.P., Babba H.** 2013. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) Bloodmeal Sources in Tunisian Cutaneous Leishmaniasis Foci: Could *Sergentomyia minuta*, which is not an Exclusive Herpetophilic Species, be Implicated in the Transmission of Pathogens?. Ann Entomol Soc Am, 106(1): 79-85.
- ❖ **Jobling B.** 1987. Anatomical drawing of biting flies. British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust, London.
- ❖ **Kalluri S., Gilruth P., Rogers D., Szczur M.** 2007. Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. PLoS Pathog, 3(10): 1361-71.



- ❖ **Kamhawi S.** 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. Trends Parasitol, 22(9): 439-45.
- ❖ **Kamhawi S., Modi G.B., Pimenta P.F., Rowton E., Sacks D.L.** 2000. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. Parasitology, 121(1): 25-33.
- ❖ **Kamhawi S.A., Molyneux D.H., Killick-Kendrick R., Milligan P.J., Phillips A., Wilkes P.J., Killick-Kendrick M.** 1987. Two populations of *Phlebotomus ariasi* in the Cévennes focus of leishmaniasis in the south of France revealed by analysis of cuticular hydrocarbons. Med Vet Entomol, 1(1): 97-102.
- ❖ **Kanjanopas K, Siripattanapipong S, Ninsaeng U, Hitakarun A, Jitkaew S, Kaewtaphaya P, Tan-ariya P, Mungthin M, Charoenwong C, Leelayoova S.** 2013. *Sergentomyia (Neophlebotomus) gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. BMC Infect Dis, 13(1): 333.
- ❖ **Kaye P., Scott P.** 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nature, 9(8): 604-15.
- ❖ **Kerr S.F.** 2000. Palaearctic Origin of *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 95(1): 75-80.
- ❖ **Kerr S.F., Merkelz R., MacKinnon C.** 2000. Further Support for a Palaearctic Origin of *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 95(4): 579-581.
- ❖ **Khaled A., Goucha S., Trabelsi S., Zermani R., Fazaa B.** 2011. Lupoid cutaneous leishmaniasis: a case report. Dermatol Ther (Heidelb), 1(2): 36-41.
- ❖ **Killick-Kendrick R.** 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol, 4(1): 1-24.
- ❖ **Killick-Kendrick R.** 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. Clin Dermatol, 17(3): 279-89.
- ❖ **Killick-Kendrick R., Leaney A.J., Ready P.D.** 1977. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol, 13(4-5): 429-40.

- ❖ **Kimutai A., Kamau Ngure P., Kiprotich Tonui W., Muita Gicheru M., Bonareri Nyamwamu L.** 2009. Leishmaniasis in northern and western Africa: a review. *Afr J Infect Dis*, 3(1): 14-25.
- ❖ **King R.J., Campbell-Lendrum D.H., Davies C.R.** 2004. Predicting Geographic Variation in Cutaneous Leishmaniasis, Colombia. *Emerg Infect Dis*, 10(4): 598-607.
- ❖ **Koehler K., Stechele M., Hetzel U., Domingo M., Schönián G., Zahner H., Burkhardt E.** 2002. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 109(1): 9-17.
- ❖ **Krenn H.W., Aspöck H.** 2012. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Struct Dev*, 41(2): 101-18.
- ❖ **Lachaud L., Marchergui-Hammami S., Chabbert E., Dereure J., Dedet J.P., Bastien P.** 2002. Comparison of six methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 40(1): 210-5.
- ❖ **Lainson R., Shaw J.J.** 1987. Evolution, classification and geographical distribution. En: Peters W., Killick-Kendrick R. (Ed) *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. (Vol. 1). London: Academic Press. London. pp. 1-120.
- ❖ **Lainson R.** 2010. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecología e taxonomía. *Rev Pan-Amaz Saude*, 1(2): 13-32.
- ❖ **Léger N., Depaquit J.** 1999. Les phlébotomes. En: Dedet J.P. (Ed). *Les leishmanioses*. Ellipses. pp. 89-108.
- ❖ **Lemes A., Molero T., Camacho R., Rivero J.C., Elcuaz R., Campo C.** 2005. Fiebre de origen desconocido y esplenomegalia en paciente inmunocompetente. Congreso de casos clínico-citológicos del GECH. Caso clínico-citológico número 3. Madrid.
- ❖ **Lemrani M., Nejjar R., Pratlong F.** 2002. A new *Leishmania tropica* zymodeme-causative agent of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Ann Trop Med Parasitol*, 96(6): 637-8.
- ❖ **Leng Y.J.** 1987. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. *Ann Trop Med Parasitol*, 81(3): 311-7.



- ❖ **León-Sanz C.M., Collantes F., Martínez-Ortega E.** 1998. Rectificación a la primera cita de flebotomos (Diptera, Psychodidae) en la Península Ibérica. *Graellsia*, 54: 114.
- ❖ **León-Sanz C.M., Collantes F., Martínez-Ortega E.** 1999. Revisión de la colección Nájera de Flebotomos (Diptera, Psychodidae) depositada en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid. *Graellsia*, 55: 217-21.
- ❖ **Lepe J.A., Ubeda J.M., Morillas F., Guevara D.C., Martín-Sánchez J., Guerrero F.J., Sanchís-Marín M.C., Perea R.** 2000. Epidemiology of the leishmaniosis in the nature reserve of Sierra de Aracena and Picos de Aroche (Southwest Spain). *Res Rev Parasitol*, 60(3-4): 113-9.
- ❖ **Lewis D.J.** 1971. Phlebotomid sandflies. *Bull World Health Organ*, 44(4): 535-51.
- ❖ **Lewis D.J.** 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus*. *Bull Br Mus Nat Hist (Ent)*, 45(2): 121-209.
- ❖ **Lindgren E., Naucke T., Menne B.** 2004. Climate variability and visceral leishmaniasis in Europe. En: WHO/TDR (Ed). Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis. Geneva. pp. 88-92.
- ❖ **Lindgren E., Naucke T.** 2008. Leishmaniasis: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. En: Menne B., Ebi K.L. (Ed). Climate change and adaptation strategies for human health. Darmstadt. pp. 131-156.
- ❖ **López L., Robayo M., Vargas M., Vélez I.D.** 2012. Thermotherapy: An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trials*, 13(1): 58.
- ❖ **López-Vélez R., Molina Moreno R.** 2005. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. *Rev Esp Salud Púb*, 79(2): 177-90.
- ❖ **López-Vélez R.** 2003. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *Ann Trop Med Parasitol*, 97(Suppl 1): 143-7.
- ❖ **Lucientes J., Blasco-Zumeta J., Zárate J.J., Arbea J.I., Latorre E.** 2001. Primeros

- registros del insecto del género *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) para los Monegros (Zaragoza, España). Bol S. E. A., 28: 123-4.
- ❖ **Lucientes J., Osacar J.J., Calvete C., Benito I., Castillo J.A.** 1994. Sobre la presencia de *Phlebotomus (Larroussius) langeroni* Nitzulescu, 1930, (Diptera: Psychodidae) en Aragón. Zapateri Rev Aragon Entomol, 4: 19-22.
 - ❖ **Luppi M.M., Malta M.C., Silva T.M., Silva F.L., Motta R.O., Miranda I., Ecco R., Santos R.L.** 2008. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet Parasitol, 155(1-2): 146-51.
 - ❖ **Magill A.J., Grögl M., Gasser R.A. Jr, Sun W., Oster C.N.** 1993. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. N Engl J Med, 328(19): 1383-7.
 - ❖ **Mahamdallie S.S., Pesson B., Ready P.D.** 2011. Multiple genetic divergences and population expansions of a Mediterranean sandfly, *Phlebotomus ariasi*, in Europe during the Pleistocene glacial cycles. Heredity (Edinb), 106(5): 714-26.
 - ❖ **Mahdi M., Elamin E.M., Melville S.E., Musa A.M., Blackwell J.M., Mukhtar M.M., Elhassan A.M., Ibrahim M.E.** 2005. Sudanese mucosal leishmaniasis: isolation of a parasite within the *Leishmania donovani* complex that differs genotypically from *L. donovani* causing classical visceral leishmaniasis. Infect Genet Evol, 5(1): 29-33.
 - ❖ **Maia C., Campino L.** 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol, 158(4): 274-87.
 - ❖ **Maia C., Dionísio L., Afonso M.O., Neto L., Cristóvão J.M., Campino L.** 2013. *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. Mem Inst Oswaldo Cruz, 108(4): 481-7.
 - ❖ **Maia C., Gomes J., Cristóvão J., Nunes M., Martins A., Rebêlo E., Campino L.** 2010. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. Vet Parasitol, 174(3): 336-40.
 - ❖ **Maia C., Seblova V., Sadlova J., Votypka J., Volf P.** 2011. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between



a viscerotropic and a dermatropic strain. PLoS Negl Trop Dis, 5(6): e1181.

- ❖ **Maia Z., Lirio M., Mistro S., Mendes C.M., Mehta S.R., Badaro R.** 2012. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis, 6(1): e1484.
- ❖ **Maingon R.D., Ward R.D., Hamilton J.G., Bauzer L.G., Peixoto A.A.** 2008. The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to *Leishmania* transmission?. Trends Parasitol, 24(1): 12-7.
- ❖ **Malta M.C., Tinoco H.P., Xavier M.N., Vieira A.L., Costa E.A., Santos R.L.** 2010. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. Vet Parasitol, 169(1-2): 193-7.
- ❖ **Mancianti F.** 2004. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?. Parassitologia, 46(1-2): 203-6.
- ❖ **Manna L., Vitale F., Reale S., Caracappa S., Pavone L.M., Morte R.D., Cringoli G., Staiano N., Gravino A.E.** 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. Vet Parasitol, 125(3): 251-62.
- ❖ **Maroli M., Bettini S.** 1977. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (I) An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto Province. Trans R Soc Trop Med Hyg, 71(4): 315-21.
- ❖ **Maroli M., Pennisi M.G., Di Muccion T., Khoury C., Gradoni L., Gramiccia M.** 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Vet Parasitol, 145: 357-60.
- ❖ **Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglia E., Genchi C., Gramiccia M., Mortarino M., Pietrobelli M., Gradoni L.** 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. Trop Med Int Health, 13(2):256-64.
- ❖ **Martín-Sánchez J., Acedo 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(3): 267-73.

- ❖ **Martín-Sánchez J., Gramiccia M., Di-Muccio T., Ludovisi A., Morillas-Márquez F.** 2004. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. Trans R Soc Trop Med Hyg, 98(4): 228-32.
- ❖ **Martín-Sánchez J., Gramiccia M., Pesson B., Morillas-Márquez F.** 2000. Genetic polymorphism in sympatric species of the genus *Phlebotomus*, with special reference to *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera, Phlebotomidae). Parasite, 7(4): 247-54.
- ❖ **Martín-Sánchez J., Guilvard E., Acedo-Sánchez C., Volf-Echeverri M., Sanchis-Marín M.C., Morillas-Márquez F.** 1994. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). Int J Parasitol, 24(3): 405-8.
- ❖ **Martín-Sánchez J., López-López M.C., Acedo-Sánchez C., Castro-Fajardo J.J., Pineda J.A., Morillas-Márquez F.** 2001. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. Parasitology, 122(6): 607-15.
- ❖ **Martín-Sánchez J., Morales-Yuste M., Acedo-Sánchez C., Barón S., Díaz V., Morillas-Márquez F.** 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. Emerg Infect Dis, 15(5): 795-798.
- ❖ **Martín-Sánchez J., Pineda J.A., Andreu-López M., Delgado J., Macías J., de la Rosa R., Morillas-Márquez F.** 2002. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. Ann Trop Med Parasitol, 96(7): 669-77.
- ❖ **Martín-Sánchez J., Pineda J.A., Morillas-Márquez F., García-García J.A., Acedo C., Macías J.** 2004. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. Am J Trop Med Hyg, 70(5): 545-8.
- ❖ **Martín-Sánchez J., Ruiz-Martínez F., Salina-Martínez-de-Lecea J.M., Sanchez-Rabasco C., Acedo-Sánchez C., Sanchis-Marín M.C., Delgado-Florencio V.,**



- Morillas-Márquez F.** 1996. *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 from southern Spain: Characterization of the strains from human visceral and cutaneous leishmaniasis and from sandflies; with a numerical analysis of the isoenzymatic data. *System Parasitol*, 33(3): 177-82.
- ❖ **Martín Vide J., Llebot J.E., Padilla E., Alcántara V.** 2007. Aspectos económicos del Cambio Climático en España. Barcelona: Caixa Catalunya. Barcelona.
- ❖ **Martínez-Ortega E.** 1985. Los flebotomos ibéricos (Diptera: Psychodidae). III. El Sureste. *An Biol*, 3 (Biología Animal, 1): 113-9.
- ❖ **Martínez-Ortega E.** 1986. Biología de los flebotomos Ibéricos (Diptera, Psychodidae) en condiciones naturales. *Ann Ist Sup Sanit*, 22(1): 73-8.
- ❖ **Martínez-Ortega E.** 1988. Caracterización de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) en condiciones naturales. *Rev Iber Parasitol*, 48(1): 79-87.
- ❖ **Martínez-Ortega E., Conesa-Gallego E.** 1987a. Estructura de las poblaciones de los flebotomos (Diptera, Psychodidae) del sureste de la Península Ibérica. Mediterránea. *Ser Estud Biol*, 9: 87-99.
- ❖ **Martínez-Ortega E., Conesa-Gallego E.** 1987b. Caracteres morfológicos de interés taxonómico de los flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Península Ibérica. *Ann Biol*, 11(Biología Animal, 3): 43-53.
- ❖ **Martínez-Ortega E., Conesa-Gallego E., Romera-Lozano H.** 1996. *Phlebotomus (Larrousius) langeroni* Nitzulescu, 1930 (Diptera, Psychodidae), espèce nouvelle pour l'Espagne. *Parasite*, 3(1): 77-80.
- ❖ **Marty P., Izri A., Ozon C., Haas P., Rosenthal E., Del Giudice P., Godenir J., Coulibaly E., Gari-Toussaint M., Delaunay P., Ferrua B., Haas H., Pratlong F., Le Fichoux Y.** 2007. A century of leishmaniasis in Alpes-Maritimes France. *Ann Trop Med Parasitol*, 101(7): 563-74.
- ❖ **Maurício I.L., Stothard J.R., Miles M.A.** 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, 16(5): 188-9.
- ❖ **Mazzoni C.J., Araki A.S., Ferreira G.E., Azevedo R.V., Barbujani G., Peixoto A.A.** 2008. Multilocus analysis of introgression between two sand fly vectors of

leishmaniasis. BMC Evol Biol, 8(1): 141.

- ❖ **Meinecke C.K., Schottelius J., Oskam L., Fleischer B.** 1999. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. Pediatrics, 104(5): e65.
- ❖ **Melic A., De Haro J.J., Mendez M., Ribera I.** 1999. Evolución y filogenia de Arthropoda. Bol Soc Entomol Aragonesa, 26. Zaragoza.
- ❖ **Mestra L., López L., Robledo S.M., Muskus C.E., Nicholls R.S., Vélez I.D.** 2011. Transfusion-transmitted visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* in an immunocompromised patient: a case report. Transfusion, 51(9): 1919-23.
- ❖ **Mihoubi I., Picot S., Hafirassou N., de Monbrison F.** 2008. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Algeria. Trans R Soc Trop Med Hyg, 102(11): 1157-9.
- ❖ **Miró G., Cardoso L., Pennisi M.G., Oliva G., Baneth G.** 2008. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol, 24(8): 371-7.
- ❖ **Miró G., Checa R., Montoya A., Hernández L., Dado D., Gálvez R.** 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. Parasit Vectors, 5(1): 60.
- ❖ **Miró G., Montoya A., Mateo M., Alonso A., García S., García A., Caballero M.J., Molina R.** 2007. A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the región of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). Parasitol Res, 101(2): 253-7.
- ❖ **Mohebbi M., Hajjarian H., Hamzavi Y., Mobedi I., Arshi S., Zarei Z., Akhoundi B., Naeini K.M., Avizeh R., Fakhar M.** 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Vet Parasitol, 129(3): 243-51.
- ❖ **Moin-Vaziri V., Depaquit J., Yaghoobi-Ershadi M.R., Oshaghi M.A., Derakhshandeh-Peykar P., Ferté H., Kaltenbach M., Bargues M.D., Léger N., Nadim A.** 2007. Intraspecific variation within *Phlebotomus sergenti* Parrot (1917)



- (Diptera: Psychodidae) based on mtDNA sequences in Islamic Republic of Iran. *Acta Trop*, 102(1): 29-37.
- ❖ **Molina R.** 1991. Experimental infections of a *Phlebotomus perniciosus* colony using different procedures. *Parassitologia*, 33(Suppl.): 425-9.
- ❖ **Molina R., Alvar J.** 1996. A simple protocol for the indirect xenodiagnosis of *Leishmania infantum* in the blood of HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol*, 90(6): 639-40.
- ❖ **Molina R., Amela C., Nieto J., San-Andres F., Gonzalez F., Castillo J.A., Lucientes J., Alvar J.** 1994. Infectivity in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88(4): 491-3.
- ❖ **Molina R., Jiménez M.I., 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.
- ❖ **Momen H., Cupolillo E.** 2000. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95(4): 583-8.
- ❖ **Moncaz A., Faiman R., Kirstein O., Warburg A.** 2012. Breeding sites of *Phlebotomus sergenti*, the sand fly vector of cutaneous leishmaniasis in the Judean Desert. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(7): e1725.
- ❖ **Monis P.T., Giglio S., Keegan A.R., Thompson R.C.A.** 2005. Emerging Technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends Parasitol*, 21(7): 340-6.
- ❖ **Morales-Yuste M.** 2012. La leishmaniosis canina en el sudeste de España. Cambios en las últimas dos décadas, factores de riesgo y criterios diagnósticos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Granada.
- ❖ **Morales-Yuste M., Acedo-Sánchez C., Barón S.D., Morillas-Márquez F., Díaz-Sáez V., Corpas-López V., Martín-Sánchez J.** 2011. Leishmaniosis en la provincia de Cádiz (sur de España): seroprevalencia y factores de riesgo de la leishmaniosis canina e incidencia en humanos. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol*, 70(2): 138-44.
- ❖ **Morales-Yuste M., Morillas-Márquez F., Díaz-Sáez V., Barón-López S., Acedo-**

- Sánchez C., Martín-Sánchez J.** 2012. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol Res*, 111(1): 155-64.
- ❖ **Moreno J., Alvar J.** 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 18(9): 399-405.
- ❖ **Moreno-Cid J.A., Pérez de la Lastra J.M., Villar M., Jiménez M., Pinal R., Estrada-Peña A., Molina R., Lucientes J., Gortázar C., de la Fuente J.; SUB/AKR Vaccine Study Group.** 2013. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine*, 31(8): 1187-96.
- ❖ **Morillas-Márquez F.** 1981. Epidemiología de las leishmaniosis en la provincia de Granada: estudio biométrico, sistemático y del ciclo anual de los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae). Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Granada.
- ❖ **Morillas-Márquez F., Barón S.D., Morales-Yuste M., Díaz-Sáez V., Martín-Sánchez J., Acedo Sánchez C., Sanchis Marín M.C.** 2010. Situación de la leishmaniosis en Granada (Sur de España) después de 25 años de estudio. *Ars Pharm*, 51(Suppl.3): 85-99.
- ❖ **Morillas-Márquez F., Benavides-Delgado I., Gonzales-Castro J., Reyes-Magaña A., Valero-López A.** 1985. Découverte de *Leishmania* sp. dans des *Rattus Rattus* de la province de Grenade (Espagne). *Ann Parasitol Hum Comp*, 60(6): 768-70.
- ❖ **Morillas-Márquez F., Castillo-Remiro A., Úbeda-Ontiveros J.M.** 1984. Nuevos datos sobre *Phlebotomus fortunatarum* Úbeda Ontiveros y cols., 1982 y presencia de *Sergentomyia fallax* (Parrot, 1921) (Diptera, Phlebotomidae) en el archipiélago canario. *Rev Ibér Parasitol*, 44(1): 29-38.
- ❖ **Morillas-Márquez F., Guevara-Benítez D.C., Úbeda-Ontiveros J.M., Gonzalez-Castro J.** 1983. Fluctuations annuelles des populations de Phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). *Ann Parasitol Hum Comp*, 58(6): 625-32.
- ❖ **Morillas-Márquez F., Martín-Sánchez J., Acedo-Sánchez C., Pineda J.A., Macías J., Sanjuan-García J.A.** 2002. *Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida):



Transmission from infected Patients to Experimental Animal under Conditions That Simulate Needle-Sharing. *Exp Parasitol*, 100(1): 71-4.

- ❖ **Morillas-Márquez F., Martín-Sánchez J., Díaz-Sáez V., Barón-López S., Morales-Yuste M., de Lima Franco F.A., Sanchís-Marín M.C.** 2010. Climate change and infectious diseases in Europe: leishmaniasis and its vectors in Spain. *Lancet Infect Dis*, 10(4): 216-7.
- ❖ **Morillas F., Sánchez-Rabasco F., Ocaña J., Martín-Sánchez J., Ocaña-Wielmi J., Acedo C., Sanchiz-Marín M.C.** 1996. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res*, 82(6): 569-70.
- ❖ **Mortarino M., Musella V., Costa V., Genchi C., Cringoli G., Rinaldi L.** 2008. GIS modeling for canine dirofilariosis risk assessment in central Italy. *Geospat Health*, 2(2): 253-61.
- ❖ **Morizot G., Delgiudice P., Caumes E., Laffite E., Marty P., Dupuy A., Sarfati C., Hadj-Rabia S., Darie H., Le Guern A.S., Salah A.B., Pratlong F., Dedet J.P., Grögl M., Buffet P.A.** 2007. Healing of Old World cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: drug effect or spontaneous evolution?. *Am J Trop Med Hyg*, 76(1): 48-52.
- ❖ **Mosqueira B., Chabi J., Chandre F., Akogbeto M., Hougard J.M., Carnevale P., Mas-Coma S.** 2010a. Efficacy of an insecticide paint against malaria vectors and nuisance in West Africa - part 2: field evaluation. *Malar J*, 9: 341.
- ❖ **Mosqueira B., Duchon S., Chandre F., Hougard J.M., Carnevale P., Mas-Coma S.** 2010b. Efficacy of an insecticide paint against insecticide-susceptible and resistant mosquitoes - part 1: laboratory evaluation. *Malar J*, 9: 340.
- ❖ **Müller N., Welle M., Lobsiger L., Stoffel M.H., Boghenbor K.K., Hilbe M., Gottstein B., Frey C.F., Geyer C., von Bomhard W.** 2009. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Vet Parasitol*, 166(3): 346-51.
- ❖ **Naucke T.J., Lorentz S., Rauchenwald F., Aspöck H.** 2011. *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908, in Carinthia: first record of the

- occurrence of sandflies in Austria (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasitol Res*, 109(4): 1161-4.
- ❖ **Naucke T.J., Menn B., Massberg D., Lorentz S.** 2008. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res*, 103(1): 65-8.
 - ❖ **Naucke T.J., Pesson B.** 2000. Presence of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae) in Germany. *Parasitol Res*, 84(4): 335-6.
 - ❖ **Nilforoushzadeh M.A., Sadeghian G., Jaffary F., Ziaei H., Shirani-Bidabad L., Mahzoni P.** 2008. Successful treatment of lupoid cutaneous leishmaniasis with glucantime and topical trichloroacetic acid (a case report). *Korean J Parasitol*, 46(3): 175-7.
 - ❖ **Norman F.F., Pérez de Ayala A., Pérez-Molina J.A., Monge-Maillo B., Zamarrón P., López-Vélez R.** 2010. Neglected tropical diseases outside the tropics. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(7): e762.
 - ❖ **Noyes H.** 1998. Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(5): 657-61.
 - ❖ **Noyes H.A., Morrison D.A., Chance M.L., Ellis J.T.** 2000. Evidence for a neotropical origin of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95(4): 575-8.
 - ❖ **Nzelu C.O., Kato H., Pupilampu N., Desewu K., Odoom S., Wilson M.D., Sakurai T., Katakura K., Boakye D.A.** 2014. First Detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* Species in *Sergentomyia* Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from an Outbreak Area of Cutaneous Leishmaniasis in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(2): e2630.
 - ❖ **Olivier M., Gregory D.J., Forget G.** 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*, 18(2): 293-305.
 - ❖ **Osorio Y., Rodriguez L.D., Bonilla D.L., Peniche A.G., Henao H., Saldarriaga O., Travi B.L.** 2012. Congenital transmission of experimental leishmaniasis in a hamster model. *Am J Trop Med Hyg*, 86(5): 812-20.



- ❖ **Otranto D., Dantas-Torres F.** 2010. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania spp.* to dogs: caution is needed. *Vet Parasitol*, 168(1): 173-4.
- ❖ **Oumeish O.Y.** 1999. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin Dermatol*, 17(3): 249-54.
- ❖ **Panagiotopoulos A., Stavropoulos P.G., Hasapi V., Papakonstantinou A.M., Petridis A., Katsambas A.** 2005. Treatment of cutaneous leishmaniasis with cryosurgery. *Int J Dermatol*, 44(9): 749-52.
- ❖ **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. *Zoonoses Public Health*, 57(7-8): e23-5.
- ❖ **Parrot L.** 1931. Observations biologiques sur *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). *Arch Inst Pasteur Algér*, 9: 442-460.
- ❖ **Perfiliev P.P.** 1968. *Phlebotomidae* (Sandflies). En: Bykhovskii B.E. (Ed) *Fauna of U.S.S.R. Diptera*, III (2). Jerusalem. Israel.
- ❖ **Perrotey S., Mahamdallie S., Pesson B., Richardson K.J., Gállego M., Ready P.D.** 2005. Postglacial dispersal of *Phlebotomus perniciosus* into France. *Parasite*, 12(4): 283-91.
- ❖ **Pesson B., Ready J.S., Benabdennbi I., Martín-Sánchez J., Esseghir S., Cadi-Soussi M., Morillas-Marquez F., Ready P.D.** 2004. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med Vet Entomol*, 18(1): 25-37.
- ❖ **Pesson B., Wallon M., Floer M.T., Kristensen A.R.** 1991. Isoenzymatic studies of Mediterranean populations of sandflies of the subgenus *Larrousius*. *Parassitologia*, 33(Suppl.): 471-6.
- ❖ **Peterson A.T., Shaw J.** 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int J Parasitol*, 33(9): 919-31.
- ❖ **Peyrafitte C.N., Grandadam M., Bessaud M., Andry P.E., Fouque F., Caro V., Diancourt L., Schuffenecker I., Pagès F., Tolou H., Zeller H., Depaquit J.** 2013.

- Diversity of *Phlebotomus perniciosus* in Provence, southeastern France: Detection of two putative new phlebovirus sequences. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 13(9): 630-6.
- ❖ **Pfeiffer D., Robinson T., Stevenson M., Stevens K., Rogers D., Clements A.** 2008. Spatial analysis in epidemiology. En: Oxford University Press (Ed). Oxford Biology. New York.
 - ❖ **Pineda J.A., Gallardo J.A., Macías J., Delgado J., Regordán C., Morillas F., Relimpio F., Martín-Sánchez J., Sánchez-Quijano A., Leal M., Lissen E.** 1998. Prevalence of and factors associated with visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus Type 1-infected patients in South Spain. *J Clin Microbiol*, 36(9): 2419-22.
 - ❖ **Pineda J.A., Macías J., Morillas F., Fernández-Ochoa J., Cara J., de la Rosa R., Mira J.A., Martín-Sánchez J., González M., Delgado J., Acedo C., Lissen E.** 2001. Evidence of Increased Risk for *Leishmania infantum* Infection Among HIV Seronegative Intravenous Drug Users from Southern Spain. *European J Clin Microbiol Infect Dis*, 20(5): 354-7.
 - ❖ **Pinna-Parpaglia M.L., Vercelli A., Cocco R., Zobba R., Manunta M.L.** 2007. Nodular lesions on the tongue in canine leishmaniosis. Case Report. *J Vet Med*, 54(8): 414-7.
 - ❖ **Portús M., Gállego M., Riera C., Aisa M.J., Fisa R., Castillejo S.** 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev Ibér Parasitol*, 62(3-4): 72-6.
 - ❖ **Portús M., Gállego M., Riera C., Fisa R., Aisa M.J., Botet J., Carrió J., Castillejo S., Iniesta L., López P., Montoya L., Muñoz C., Serra T., Gállego J.** 2007. A review of human and canine leishmaniosis in Catalonia, and associated vector distribution. *Rev Ibér Parasitol*, 67(1-4): 59-67.
 - ❖ **Pratlong F., Dereure J., Ravel C., Lami P., Balard Y., Serres G., Lanotte G., Rioux J.A., Dedet J.P.** 2009. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048



strains. *Trop Med Int Health*, 14(9): 1071-85.

- ❖ **Pratlong F., Lami P., Ravel C., Balard Y., Dereure J., Serres G., Baidouri F.E., Dedet J.P.** 2013. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology*, 140(4): 423-34.
- ❖ **Pratlong F., Rioux J.A., Marty P., Faraut-Gambarelli F., Dereure J., Lanotte G., Dedet J.P.** 2004. Isoenzymatic analysis of 712 Strains of *Leishmania infantum* in the South of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol*, 42(9): 4077-82.
- ❖ **Quinnell R.J., Courtenay O.** 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14): 1915-34.
- ❖ **Ramos H., Saint-Pierre-Chazalet M., Bolard J., Cohen B.E.** 1994. Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(5): 1079-84.
- ❖ **Ramaoui K., Guernaoui S., Boumezzough A.** 2008. Entomological and epidemiological study of a new focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *Parasitol Res* 103(4): 859-63.
- ❖ **Ramírez G.A., Peñafiel-Verdú C., Altimira J., García-González B., Vilafranca M.** 2013. Naturally acquired visceral leishmaniosis in a captive Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus rufogriseus*). *Vet Pathol*, 50(1): 188-90.
- ❖ **Ready P.D.** 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 27(2): 399-412.
- ❖ **Ready P.D.** 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, 15(10): pii=19505.
- ❖ **Ready P.D.** 2011. Should sand fly taxonomy predict vectorial and ecological traits?. *J Vector Ecol*, 36(Suppl.1): S17-22.
- ❖ **Ready P.D.** 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol*, 58(1): 227-50.
- ❖ **Reale S., Maxia L., Vitale F., Glorioso N.S., Caracappa S., Vesco G.** 1999. Detection

of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. J Clin Microbiol, 37(9): 2931-5.

- ❖ **Rebollar E.A.** 1995. Bionómia de *Lutzomyia spp.* (Diptera, Psychodidae) vectores de leishmaniasis cutánea localizada en el área endémica del Ejido La Libertad, Escarcega, Campeche, México. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- ❖ **Reiter P.** 2008. Climate change and mosquito-borne disease: knowing the horse before hitching the cart. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 27(2): 383-98.
- ❖ **Reiter P.** 2008. Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart. Malaria J, 7(Sup.1): S3.
- ❖ **Reithinger R., Mohsen M., Wahid M., Bismullah M., Quinnell R.J., Davies C.R., Kolaczinski J., David J.R.** 2005. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. Clin Infect Dis, 40(8): 1148-55.
- ❖ **Reuss S.M., Dunbar M.D., Calderwood Mays M.B., Owen J.L., Mallicote M.F., Archer L.L., Wellehan J.F. Jr.** 2012. Autochthonous *Leishmania siamensis* in horse, Florida, USA. Emerg Infect Dis, 18(9): 1545-7.
- ❖ **Rhajaoui M., Fella H., Pratlong F., Dedet J.P., Lyagoubi M.** 2004. Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus. Trans R Soc Trop Med Hyg, 98(5): 299-301.
- ❖ **Riera C., Fisa R., López P., Ribera E., Carrió J., Falcó V., Molina I., Gállego M., Portús M.** 2004. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 23(12): 899-904.
- ❖ **Rioux J.A., Carron S., Dereure J., Périères J., Zeraia L., Franquet E., Babinot M., Gállego M., Prudhomme J.** 2013. Ecology of leishmaniasis in the South of France. 22. Reliability and representativeness of 12 *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) sampling stations in Vallespir



(eastern French Pyrenees region). *Parasite*, 20: 34.

- ❖ **Rioux J.A., Croset H., Lanotte G.** 1977. Écologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation. *Coll Int CNRS*, 39: 295-305.
- ❖ **Rioux J.A., Croset H., Léger N.** 1974a. Presence en Espagne de *Phlebotomus alexandri* Sinton, 1928 (Diptera-Psychodidae). *Ann Parasitol Hum Comp*, 69: 126-8.
- ❖ **Rioux J.A., Croset H., Léger N.** 1974b. Presence en Espagne de *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc et Rioux, 1970 (Diptera-Psychodidae). *Ann Parasitol Hum Comp*, 69: 505-7.
- ❖ **Rioux J.A., Golvan Y.J., Croset H., Houin R., Juminer B., Bain O., Tour S.** 1967. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 1. Les phlébotomes. Echantillonnage – Ethologie. *Ann Parasitol Hum Comp*, 42(6): 561-603.
- ❖ **Rioux J.A., Golvan Y.J.** 1969. Épidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France. I. Les vecteurs (Phlébotomes). Monographie de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. pp. 20-126.
- ❖ **Rioux J.A., Guilvard E., Gállego J., Moreno G., Pratlong F., Portús M., Rispail P., Gállego M., Bastien P.** 1986a. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). En: Rioux J.A. (Ed). *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques IMEEE. Montpellier. France. pp. 439-44.
- ❖ **Rioux J.A., Houin R., Baudouy J.P., Croset H., Tour S.** 1970. Présence en Corse de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917. *Ann Parasitol*, 45(3): 343-56.
- ❖ **Rioux J.A., Jarry D.M., Lanotte G., Maazoun R., Killick-Kendrick R.** 1984. Ecology of leishmaniasis in Southern France. 18. Enzymatic identification of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 Isolated from *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, spontaneously infected in the Cévennes. *Ann Parasitol Hum Comp*, 59(4): 331-33.
- ❖ **Rioux J.A., Jarry D.M., Maazoun R., Wallbanks K.** 1982. Confirmation de

- l'existence en France continentale de *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917. Ann Parasitol Hum Comp, 57(6): 647-8.
- ❖ **Rioux J.A., Juminer B., Gibily H.** 1966. *Phlebotomus (Phlebotomus) chadlii* n sp. (Diptera-Psychodidae). Ann Parasitol Hum Comp, 41(1): 83-9.
- ❖ **Rioux J.A., Killick-Kendrick R., Périères J., Turner D.P., Lanotte G.** 1980. Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 13. Les sites de «flanc de coteau», biotopes de transmission privilégiés de la leishmaniose viscérale en Cévennes. Ann Parasitol Hum Comp, 55(4): 445-53.
- ❖ **Rioux J.A., Lanotte G., Petter F., Dereure J., Akalay O., Pratlong F., Velez I.D., Fikri N.B., Maazoun R., Denial M., Jarry D.M., Zahaf A., Ashford R.W., Cadi-Soussi M., Killick-Kendrick R., Benmansour N., Moreno G., Périères J., Guilvard E., Zribi M., Kennou M.F., Rispaïl P., Knechtli R., Serres E.** 1986b. Les leishmanioses cutanées du bassin Méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique. L'exemple de trois foyers, tunisien, marroccain et français. En: Rioux J.A. (Ed). *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques IMEEE. Montpellier. France. pp. 365-95.
- ❖ **Rioux J.A., Lanotte G., Pratlong F.** 1986c. *Leishmania killicki* n.sp. (Kinetoplastida-Trypanosomatidae). En: Rioux J.A. (Ed). *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques IMEEE. Montpellier. France. pp. 139-42.
- ❖ **Rispaïl P., Dereure J., Jarry D.** 2002. Risk zones of human Leishmaniasis in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. Mem Inst Oswaldo Cruz, 97(4): 477-83.
- ❖ **Rispaïl P., Léger N.** 1998. Numerical taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 2. Restatement of classification upon subgeneric morphological characters. Mem Inst Oswaldo Cruz, 93(6): 787-93.
- ❖ **Rittig M.G., Bogdan C.** 2000. *Leishmania*-Host-Cell Interaction: Complexities and Alternative Views. Parasitol Today, 16(7): 292-7.
- ❖ **Rivas-Martínez S., Bandullo J.M., Serrada R., Allue-Andrade J.L., Monero-del-Burgo J.L., González-Rebollar J.L.** 1987. Memoria del mapa de series de vegetación



de España. Edit. ICONA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

- ❖ **Rodríguez-Cortés A., Ojeda A., López-Fuentes L., Timón M., Altet L., Solano-Gallego L., Sánchez-Robert E., Francino O., Alberola J.** 2007. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol*, 37(6): 683-93.
- ❖ **Rojas E., Scorza J.V.** 1996. Presence of metacyclical promastigotes of *Leishmania pifanoi* in the hypopharynx of *Lutzomyia youngi* and their sugar consumption. *Rev Saude Publica*, 30(3): 240-7.
- ❖ **Rose K., Curtis J., Baldwin T., Mathis A., Kumar B., Sakthianandeswaren A., Spurck T., Low Choy J., Handman E.** 2004. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int J Parasitol*, 34(6): 655-64.
- ❖ **Sacks D.L.** *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol*, 3(4): 189-96.
- ❖ **Salazar M., Castro E.** 2001. Leishmaniosis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Revisión clínica de los casos en el hospital regional de Pucallpa de 1997 a 1999. *Dermatol Peruana*, 11(1): 1-7.
- ❖ **Salomón O.D., Quintana M.G., Mastrángelo A.V., Fernández M.S.** 2012. Leishmaniasis and climate change-case study: Argentina. *J Trop Med*, 2012: 601242.
- ❖ **Sánchez-Saldaña L., Sáez-Anduaga E., Pancorbo-Mendoza J., Zegarrra-Del-Carpio R., Garcés-Velasco N., Regis-Roggero A.** 2004. Leishmaniasis. *Dermatol Peruana*, 14(2): 82-98.
- ❖ **Sanchís-Marín M.C., Morillas-Márquez F., González-Castro J., Benavides-Delgado I., Reyes-Magaña A.** 1986a. Dinámica estacional de los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae) de la provincia de Almería (España). *Rev Ibér Parasitol*, 46(3): 285-91.
- ❖ **Sanchís-Marín M.C., Villegas G., Morillas Márquez F.** 1986b. Flebotomos y Leishmaniosis en la provincia de Almería. *Rev Sanid Hig Publica*, 60(11-12): 1131-9.
- ❖ **Sanchís-Marín M.C., Martín-Sánchez J., Amate P., Acedo-Sánchez C., Miras N.,**

- Mostapha L., Morillas F.** 1997. Estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la comarca del Campo de Níjar (Almería). *Ars Pharmaceutica*, 38(1): 53-61.
- ❖ **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(1-2): 117-20.
- ❖ **Schlein Y.** 1993. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today*, 9(7): 255-8.
- ❖ **Schlein Y., Jacobson R.L., Müller G.C.** 2001. Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 65(4): 300-3.
- ❖ **Schnur L.F., Nasereddin A., Eisenberger C.L., Jaffe C.L., El Fari M., Azmi K., Anders G., Killick-Kendrick M., Killick-Kendrick R., Dedet J.P., Pratlong F., Kanaan M., Grossman T., Jacobson R.L., Schonian G., Warburg A.** 2004. Multifarious characterization of *Leishmania tropica* from a judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector. *Am J Trop Med Hyg*, 70(4): 364-72.
- ❖ **Schönian G., Mauricio I., Cupolillo E.** 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. *Trends Parasitol*, 26(10): 466-9.
- ❖ **Schraner C., Hasse B., Hasse U., Baumann D., Faeh A., Burg G., Grimm F., Mathis A., Weber R., Günthard H.F.** 2005. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin Infect Dis*, 40(12): e120-4.
- ❖ **Scorza J.V., Valera M., de Scorza C., Carnevali M., Moreno E., Lugo-Hernandez A.** 1979. A new species of *Leishmania* parasite from the Venezuelan Andes region. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 73(3): 293-8.
- ❖ **Semenza J.C., Menne B.** 2009. Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infect Dis*, 9(6): 365-75.
- ❖ **Semião-Santos S.J., el Harith A., Ferreira E., Pires C.A., Sousa C., Gusmão R.** 1995. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res*



81(3): 235-9.

- ❖ **Senghor M.W., Faye M.N., Faye B., Diarra K., Elguero E., Gaye O., Bañuls A.L., Niang A.A.** 2011. Ecology of phlebotomine sand flies in the rural community of Mont Rolland (Thiès region, Senegal): area of transmission of canine leishmaniasis. PLoS One, 6(3): e14773.
- ❖ **Shakya N., Bajpai P., Gupta S.** 2011. Therapeutic switching in *Leishmania* chemotherapy: a distinct approach towards unsatisfied treatment needs. J Parasit Dis, 35(2): 104-12.
- ❖ **Sharquie K.E., al-Hamamy H., el-Yassin D.** 1998. Treatment of cutaneous leishmaniasis by direct current electrotherapy: the Baghdadin device. J Dermatol, 25(4): 234-7.
- ❖ **Singh S., Sivakumar R.** 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med, 49(1): 55-60.
- ❖ **Singh N., Kumar M., Singh R.K.** 2012. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pac J Trop Med, 5(6): 485-97.
- ❖ **Sobrino R., Ferroglio E., Oleaga A., Romano A., Millan J., Revilla M., Arnal M.C., Trisciuglio A., Gortázar C.** 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. Vet Parasitol, 155(3): 198-203.
- ❖ **Solano-Gallego L., Baneth G.** 2008. Canine leishmaniosis – a challenging zoonosis. Eur J Companion Anim Pract, 18(3): 232-41.
- ❖ **Solano-gallego L., Fernández-Bellon H., Serra P., Gállego M., Ramis A., Fondevila D., Ferrer L.** 2003. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. Equine Vet J, 35(3): 320-3.
- ❖ **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(2): 560-3.
- ❖ **Solano-Gallego L., Rossi L., Scroccaro A.M., Montarsi F., Caldin M., Furlanello T., Trotta M.** 2012. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus*

sanguineus male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*, 5(1): 98.

- ❖ **Sousa A.Q., Pompeu M.M., Sólón F.R., Frutuoso M.S., Teixeira M.J., Silva T.M.** 2006. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis: A Patient with 749 Lesions. *Braz J Infect Dis*, 10(3): 230.
- ❖ **Srivastava A., Nagpal B.N., Joshi P.L., Paliwal J.C., Dash A.P.** 2009. Identification of malaria hot spots for focused intervention in tribal state of India: a GIS based approach. *Int J Health Geogr*, 8(1): 30.
- ❖ **Srividya G., Kulshrestha A., Singh R., Salotra O.** 2012. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res*, 110(3): 1065-78.
- ❖ **Stensgaard A.S., Saarnak C.F.L., Utzinger J., Vounatsou P., Simoonga C., Mushinge G., Rahbek C., Mohlenberg F., Kristensen T.K.** 2009. Virtual globes and geospatial health: the potencial of new tools in the management and control of vector-borne diseases. *Geospatial Health*, 3(2): 127-41.
- ❖ **Strauss-Ayali D., Jaffe C.L., Burshtain O., Gonen L., Baneth G.** 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis*, 189(9): 1729-33.
- ❖ **Sudhakar S., Srinivas T., Palit A., Kar S.K., Battacharya S.K.** 2006. Mapping of risk prone areas of kala-azar (Visceral leishmaniasis) in parts of Bihar state, India: an RS and GIS approach. *J Vect Borne Dis*, 43(3): 115-22.
- ❖ **Sundar S., Rai M.** 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagnostic Laborat Immunol*, 9(5): 951-8.
- ❖ **Svobodová M., Votýpka J., Nicolas L., Volf, P.** 2003. *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes Infect*, 5(5): 361-64.
- ❖ **Svobodová M., Votypka J., Peckova J., Dvorak V., Nasereddin A., Baneth G., Sztern J., Kravchenko V., Orr A., Meir D., Schnur L.F., Volf P., Warburg A.** 2006. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, northern Israel. *Emerg Infect Dis*, 12(12) : 1860-8.



- ❖ **Swofford D.L., Olsen G.J., Waddle P.J., Hillis D.M.** 1996. Phylogenetic inference. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable M.K. (Eds). Molecular systematics (2ª Edición). Sinauer Associates. Sunderland. Estados Unidos de América.
- ❖ **Talmi-Frank D., Jaffe C.L., Nasereddin A., Warburg A., King R., Svobodova M., Peleg O., Baneth G.** 2010a. *Leishmania tropica* in Rock Hyraxes (*Procavia capensis*) in a Focus of Human Cutaneous Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, 82(5): 814-8.
- ❖ **Talmi-Frank D., Kedem-Vaanunu N., King R., Bar-Gal G.K., Edery N., Jaffe C.L., Baneth G.** 2010b. *Leishmania tropica* Infection in Golden Jackals and Red Foxes, Israel. Emerg Infect Dis, 16(12): 1973-5.
- ❖ **Tasew G., Kebede A., Wolday D., Gadisa E., Britton S., Eidsmo L., Akuffo H.** 2009. Low-cost liquid medium for in vitro cultivation of *Leishmania* parasites in low-income countries. Glob Health Action, 2: 10.
- ❖ **ter Horst R., Collin S.M., Ritmeijer K., Bogale A., Davidson R.N.** 2008. Concordant HIV infection and visceral leishmaniasis in Ethiopia: the influence of antiretroviral treatment and other factors on outcome. Clin Infect Dis, 46(11): 1702-9.
- ❖ **Theodor O.** 1958. Psychodidae, Phlebotominae. En: E. Schweizerbart (Ed) Die Fliegen der Palearktischen Region. Stuttgart. Alemania.
- ❖ **Thomson M.C., Elnaiem D.A., Ashford R.W., Connor S.J.** 1999. Towards a kala azar risk map for Sudan: mapping the potential distribution of *Phlebotomus orientalis* using digital data of environmental variables. Trop Med Int Health, 4(2): 105-13.
- ❖ **ul Bari A.** 2006. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. J Pakistan Assoc Dermatol, 16: 24-7.
- ❖ **Urbano J., Sánchez-Moreno M., Ordóñez L., Longoni S.Z., Olmo F., Rosales M., Alunda J.M., Gutiérrez-Sánchez R., Marín C.** 2009. Canine Leishmaniosis: New isolates in Madrid (Spain). Rev Ibero-Latinoam Parasitol, 68(2): 108-16.
- ❖ **Urrutia S.** 2001. Leishmaniosis cutánea. La piel en la práctica diaria. Piel, 16(5): 253-7.
- ❖ **Urrutia S., García C., Schoendorf C., Sáez A., Olivares M., García-Almagro D.** 2000. Leishmaniasis cutánea en la provincia de Toledo. Estudio de 43 pacientes. Actas

Dermosifiliogr, 91(1-2): 1-8.

- ❖ **Valcárcel Y., Bastero R., Anegón M., González S., Gil A.** 2008. Epidemiología de los ingresos hospitalarios por leishmaniosis en España (1999-2003). *Enf Infecc Microbiol Clín*, 26(5): 278-81.
- ❖ **Volf P., Myskova J.** 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*, 23(3): 91-2.
- ❖ **Wardrop N.A., Fèvre E.M., Atkinson P.M., Kakembo A., Welburn S.C.** 2012. An exploratory GIS-based method to identify and characterise landscapes with an elevated epidemiological risk of Rhodesian human African trypanosomiasis. *BMC Infect Dis*, 12(1): 316.
- ❖ **Weiss F., Vogenthaler N., Franco-Paredes C., Parker S.R.** 2009. *Leishmania tropica*-induced cutaneous and presumptive concomitant viscerotropic leishmaniasis with prolonged incubation. *Arch Dermatol*, 145(9): 1023-6.
- ❖ **Weng Q., Yang S.** 2004. Managing the adverse thermal effects of urban development in a densely populated Chinese city. *J Environ Manage*, 70(2): 145-56.
- ❖ **World Health Organization (W.H.O.).** 2004. Report on Leishmaniasis. Report of the Scientific Working Group on Leishmaniasis. Geneva.
- ❖ **World Health Organization (W.H.O.).** 2007. Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection. Addis Ababa. Ethiopia.
- ❖ **World Health Organization (W.H.O.).** 2007. Report of the consultative meeting on cutaneous leishmaniasis. Geneva.
- ❖ **World Health Organization (W.H.O.).** 2010. Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva.
- ❖ **Young D.G., Duncan M.A.** 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*. Gainesville, Florida.
- ❖ **Yahia H., Ready P.D., Hamdani A., Testa J.M., Guessous-Idrissi N.** 2004. Regional



genetic differentiation of *Phlebotomus sergenti* in three Moroccan foci of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Parasite*, 11(2): 189-99.

- ❖ **Yin H., Norris D.E., Lanzaro G.C.** 2000. Sibling species in the *Lutzomyia longipalpis* complex differ in levels of mRNA expression for the salivary peptide, maxadilan. *Insect Mol Biol*, 9(3): 309-14.
- ❖ **Zea D.F., Prager M., Figueroa R.A., Miranda M.C.** 2009. Mucosal complication of cutaneous leishmaniasis. *Biomédica*, 29(1): 9-11.
- ❖ **Zerpa O., Borges R., Loyo N., Galindo W., Belisario D., Rodríguez N., Sosa A., Convit J.** 2002. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. *Dermatol Venezolana*, 40(4): 106-10.
- ❖ **Zhou X.N., Lv S., Yang G.J., Kristensen T.K., Bergquist N.R., Utzinger J., Malone J.B.** 2009. Spatial epidemiology in zoonotic parasitic diseases: insights gained at the 1st International Symposium on Geospatial Health in Lijiang, China, 2007. *Parasit Vectors*, 2(1): 10.
- ❖ **Zink A.R., Spigelman M., Schraut B., Greenblatt C.L., Nerlich A.G., Donoghue H.D.** Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerg Infect Dis*, 12(10): 1616-7.



7. ANEXO





7. ANEXO

Tablas resumen de captura de flebotomos

Tabla 1: Número total de capturas por especie y matiz bioclimático

Matiz Bioclimático	Sm	Pp	Pa	Ps	Ppa	Pal	Total
Termomediterráneo	12955	759	73	125	118	1	14031
Mesomediterráneo	12408	1381	130	143	153	0	14215
Supramediterráneo	1612	116	22	8	5	0	1763
Oromediterráneo	10	0	0	0	0	0	10
TOTAL	26985	2256	225	276	276	1	30019

Tabla 2: Abundancia por especie y matiz bioclimático

Matiz Bioclimático	% Sm	% Pp	% Pa	% Ps	% Ppa	% Pal
Termomediterráneo	92,331	5,409	0,520	0,891	0,841	0,007
Mesomediterráneo	87,288	9,715	0,915	1,006	1,076	0,000
Supramediterráneo	91,435	6,580	1,248	0,454	0,284	0,000
Oromediterráneo	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
TOTAL	89,893	7,515	0,750	0,919	0,919	0,003

Tabla 3: Densidad por especie y matiz bioclimático

Matiz Bioclimático	Dens. Sm	Dens. Pp	Dens. Pa	Dens. Ps	Dens. Ppa	Dens. Pal
Termomediterráneo	188,085	11,000	1,058	1,818	1,713	0,015
Mesomediterráneo	142,437	15,820	1,489	1,645	1,756	0,000
Supramediterráneo	53,790	3,870	0,734	0,267	0,167	0,000
Oromediterráneo	0,546	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
TOTAL	132,110	11,030	1,100	1,353	1,353	0,005

Tabla 4: Abundancia por especie y matiz bioclimático teniendo en cuenta sólo al género *Phlebotomus*

Matiz Bioclimático	% Pp	% Pa	% Ps	% Ppa	% Pal	Nº Total
Termomediterráneo	70,539	6,784	11,617	10,967	0,093	1076
Mesomediterráneo	76,425	7,194	7,914	8,467	0,000	1807
Supramediterráneo	76,821	14,570	5,298	3,311	0,000	151
TOTAL	74,357	7,416	9,097	9,097	0,033	3034



Direcciones electrónicas de las imágenes incluidas en la Tesis Doctoral en las que no se menciona artículo de publicación

Figuras:

Figura 2:

A y B: http://www.16deabril.sld.cu/rev/243/leishmaniosis_tegumentaria.html

C: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/fofia/vol6_n1/galeria.htm

Figura 3:

A: http://en.wikipedia.org/wiki/Peter_Borovsky

B: http://en.wikipedia.org/wiki/William_Leishman

C: <http://www.nodo50.org/amigosdelosgalgos/leishmania.html>

D: http://en.wikipedia.org/wiki/Ronald_ross

Figura 5:

<http://www.bancodeimagenesmedicina.es/banco-de-imagenes/categorias/retratos/pitaluga-y-fattorini-gustavo-550.html>

Figura 6:

http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/

Figura 9:

A: <http://www.sciencephoto.com/media/305799/view>

B: <http://www.cvbd.org/en/sand-fly-borne-diseases/leishmaniosis/pathogens/>

Figura 11:

A: <http://www.leishrisk.net/Default.aspx?Menu=MenuMain&MIID=34&WPID=40&L=E>

B: <http://www.sciencephoto.com/media/259267/view>

Figura 12:

http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/

Figura 15:

<http://fundacionio.org/img/parasitology/leishmania.html>

Figura 16:

http://www.who.int/leishmaniasis/Visceral_Leishmaniasis_hr.jpg

Figura 19:

B: <http://www.documentingreality.com/forum/f149/jericho-buttons-106299/>

Figura 22:

<http://www.elbercial.com/2012/04/17/leishmaniosis-canina/>



Figura 33:

A: http://www.europeana.eu/portal/record/9200104/wellcomeimages_org_record_W0042574.html?start=14&query=phlebotomus&startPage=1&rows=24

Figura 34:

A: <https://googledrive.com/host/0B1IL5zI60TcWbUffT3ZyOFZrMUk/phlebotomus2%28larva%29.jpg>

B: <http://gruppoleishmania.org/es/flebotomo-como-larva-de-estadio-iv-con-cuatro-ap%C3%A9ndice-s-caudales>

C: http://wellcomeimages.org/indexplus/result.html?*sform=wellcome-images&IXACTION=query&%24%3Dtoday=&IXFIRST=1&%3Did_ref=W0046058&IXSPFX=templates/t&IXFPFX=templates/t&IXMAXHITS=1

Figura 35:

A: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/flies/Lutzomyia_shannoni.htm

B: <https://googledrive.com/host/0B1IL5zI60TcWbUffT3ZyOFZrMUk/phlebotomus3%28ninf%29.jpg>

Figura 47:

A: <http://www.pathobio.sdu.edu.cn/sdjsc/engparabook/ch082.htm>

B: http://www.pathobio.sdu.edu.cn/sdjsc/theory_eng_ppt/Flagellates.ppt

Figura 50:

Perro: <http://www.nocturnar.com/forum/mascotas-y-animales/636290-perro-beagle-razas-de-perros.html>

Gato: <https://www.tiendanimal.es/purina-proplan-gato-light-pavo-p-7450.html>

Lobo: <http://tic1993.blogspot.com.es/>

Zorro rojo: <http://www.blogodisea.com/2011/desde-cuando-ilegal-caza-del-zorro-gran-bretana/preguntas-respuestas/>

Liebre: http://avesazulyverde.blogspot.com.es/2013_04_01_archive.html

Rata: <http://faluke.blogspot.com.es/2010/11/rattus-rattus.html>

Flebotomo: <http://www.elbercial.com/2012/04/17/leishmaniosis-canina/>

Hombre: <http://www.diverbo.es/es/blog/reglas-basicas-para-evitar-errores-comunes/gente-2/>

Figura 54:

Hombre: <http://www.diverbo.es/es/blog/reglas-basicas-para-evitar-errores-comunes/gente-2/>

Perro: <http://www.nocturnar.com/forum/mascotas-y-animales/636290-perro-beagle-razas-de-perros.html>

Damán: <http://www.warwicktarboton.co.za/other%20crea%20pgs/028RoHyr.html>

Flebotomo: <http://www.elbercial.com/2012/04/17/leishmaniosis-canina/>

Rata: <http://faluke.blogspot.com.es/2010/11/rattus-rattus.html>

Zorro rojo: <http://www.blogodisea.com/2011/desde-cuando-ilegal-caza-del-zorro-gran-bretana/preguntas-respuestas/>

Chacal dorado: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flickr_-_Rainbirder_-_Golden_Jackal.jpg

Portada:

Phlebotomus: <http://www.cvbd.org/en/media-gallery/photos/>

Logo UGR bronce: http://ceres.ugr.es/info_eng/

Europa en imagen satélite: <http://butisitart-butisitart.blogspot.com.es/2009/01/europa.html>

Satélite: <http://www.electronica-basica.com/satelites.html>



Contraportada:

Logo UGR: <http://secretariageneral.ugr.es/pages/imagen/descargas/descarga>

Logo Facultad Farmacia: <https://twitter.com/farmappgranada>

ADN: <http://humanbeingelblogdeandresortega.wordpress.com/2012/04/20/el-adn-del-intra-emprendedor-como-ventaja-competitiva/>

Encabezados de página:

Encabezado del Índice:

<http://gregtork.files.wordpress.com/2009/01/indice-de-un-libro.jpg>

Encabezado de la Introducción:

Leishmaniosis cutánea: <http://www.saludnews24.com.ar/noticias/salud/5739-salud-publica-asiste-a-paciente-con-leishmaniasis-en-misiones.html>

Leishmania: <http://www.biolib.cz/en/image/id17375/>

Encabezado de los Objetivos:

<http://javiervite.wordpress.com/2013/06/20/objetivos-generales-especificos-y-diseno/>

Encabezado Material, Métodos y Resultados:

ADN: <http://humanbeingelblogdeandresortega.wordpress.com/2012/04/20/el-adn-del-intra-emprendedor-como-ventaja-competitiva/>

Flebotomo: <http://www.elbercial.com/2012/04/17/leishmaniosis-canina/>

Encabezado Discusión General:

Pensador de Rodín-1: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rodin,_El_Pensador-3.JPG

Pensador de Rodín-2: <http://temasdederecho.wordpress.com/tag/el-pensador-de-rodin/>

Encabezado Conclusiones:

Manos con bombilla: <http://www.nial-advocats.com/blog/2013/07/03/conclusiones-jornadas-arte-y-galerismo-i/>

Dado con letras: http://www.aetrabajosocialysalud.es/1/xi_congreso_conclusiones_380048.html

Encabezado Bibliografía:

Libros y gafas: http://ocw.um.es/cc.-sociales/metodologias-de-la-investigacion-en-educacion/bibliografia?set_language=en

Libros: <http://mercantil.blogs.lexnova.es/tag/bibliografia/>

Encabezado Anexo:

Clips con @: <http://www.ivirtuagroup.com.br/Tz0Classic-Tz0EmailWarp.aspx>

Carpeta: <https://amigogeek.net/artigo/como-enviar-arquivos-grandes-em-um-e-mail/>