

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Parasitología



La leishmaniosis canina en el sudeste de España. Cambios en las últimas dos décadas, factores de riesgo y criterios diagnósticos.

Memoria que presenta el licenciado Manuel Morales Yuste para aspirar al Grado de Doctor.

Granada, 2012.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Manuel Morales Yuste
D.L.: GR 181-2013
ISBN: 978-84-9028-301-1

Francisco Morillas Márquez y Joaquina Martín Sánchez, Profesores 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 siguiente Tesis Doctoral titulada **“La leishmaniosis canina en el sudeste de España. Cambios en las últimas dos décadas, factores de riesgo y criterios diagnósticos”**, ha sido realizado bajo su dirección conjunta por el licenciado en Farmacia por la Universidad de Granada, Manuel Morales Yuste, y lo encuentran conforme para ser presentado y aspirar al grado de Doctor 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 25 de Mayo de 2012.

Fdo. Francisco Morillas Márquez

Fdo. Joaquina Martín Sánchez

Francisco Morillas Márquez, Catedrático de la Universidad de Granada, y
Joaquina Martín Sánchez, Profesora Titular de la Universidad de Granada,

AUTORIZAN la presentación de la Tesis **“La leishmaniosis canina en el sudeste de España. Cambios en las últimas dos décadas, factores de riesgo y criterios diagnósticos”** para su defensa, e informan que cumple todos los requisitos legales.

Fdo. Francisco Morillas Márquez

Fdo. Joaquina Martín Sánchez

Granada, a 25 de Mayo de 2012.

El Dr. Francisco Morillas Márquez, Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

AUTORIZA la presentación de la Tesis **“La leishmaniosis canina en el sudeste de España. Cambios en las últimas dos décadas, factores de riesgo y criterios diagnósticos”**, de la que es autor Manuel Morales Yuste, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Fdo. Francisco Morillas Márquez

Granada, a 25 de Mayo de 2012.

Los directores de la tesis Francisco Morillas Márquez y Joaquina Martín Sánchez, y el doctorando Manuel Morales Yuste.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que:

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 25 de Mayo de 2012.

Directores de la Tesis:

Fdo. Francisco Morillas Márquez

Fdo. Joaquina Martín Sánchez

Doctorando:

Fdo. Manuel Morales Yuste

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Manuel y Esperanza, y hermanas, Ana y Esperanza, por estar ahí durante estos años y en los momentos más difíciles. Gracias de todo corazón por haber sido para mí fuente de inspiración y modelo a seguir de lucha y constancia.

A mis directores de tesis, Francisco Morillas Márquez y Joaquina Martín Sánchez por su eterno apoyo, consejos y paciencia. Sin sus esfuerzos para facilitarme todos los medios suficientes este trabajo nunca habría sido posible. Es para mí un honor considerarme vuestro amigo. Durante estos años os habéis ganado mi gratitud y admiración.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a Rocío Benítez, Javier Adroher, Luis Hueli, Margarita Campos, M^{ra} Josefa Lozano, Inmaculada Mañas, Marina Jiménez, Amparo Soler y Santiago Hidalgo por hacerme sentir en familia. En especial a Victoriano Díaz por los buenos ratos de fructífera conversación durante los muestreos de campo y a Adela Valero por preocuparte por mí en todo momento. Sois geniales.

Un agradecimiento especial a Ana, mi economista favorita, por la estabilidad que me aportas en todo momento y por iluminarme la vida con tu positividad contagiosa. Por tu cariño y apoyo incondicional.

A Sergio y Carmen, mis compis de siempre, por amenizarme las horas de trabajo en el laboratorio con vuestra amistad y sabios consejos. A Gema y Víctor, los últimos fichajes, por vuestra simpatía y por aportar un toque de aire fresco al grupo.

No puedo terminar este apartado sin recordar a un amigo con quien he compartido muchas conversaciones personales y horas de trabajo, un amigo de esos que quedan inmortalizados en la memoria aunque ya no estén entre nosotros. Gracias Jose Antonio por haberme honrado con tu maravillosa amistad.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis y que han hecho posible este sueño.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN _____	1
I.1. Género <i>Leishmania</i> . Aspectos generales _____	1
I.2. Clasificación taxonómica _____	4
I.3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. _____	7
I.4. Eco-epidemiología de la leishmaniosis por <i>Leishmania infantum</i> _____	10
I.5. Leishmaniosis en la Cuenca Mediterránea _____	16
I.5.1. Leishmaniosis humana en España _____	18
I.5.2. Leishmaniosis canina en España _____	21
I.6. Diagnóstico de la leishmaniosis _____	27
I.6.1. Signos clínicos _____	27
I.6.1.a. Leishmaniosis humana _____	27
I.6.1.b. Leishmaniosis canina _____	30
I.6.2. Identificación mediante microscopía y aislamiento _____	33
I.6.3. Inoculación en animales de cultivo y xenodiagnóstico _____	33
I.6.4. Detección de antígenos circulantes _____	34
I.6.5. Métodos inmunológicos _____	34
I.6.6. Métodos moleculares _____	38
I.6.7. Comparación de métodos en el diagnóstico de la leishmaniosis canina _____	40
I.7. Los flebotomos en España _____	41
I.7.1. Distribución _____	41
I.7.2. Caracteres morfológicos generales de la familia <i>Phlebotomidae</i> _____	46
I.7.3. Caracteres morfológicos diferenciales de las especies descritas en España _____	55
I.8. Papel de la temperatura como parámetro climático en la dinámica de las enfermedades transmitidas por vectores _____	67

II. OBJETIVOS	71
III. RESULTADOS	73
Artículo 1. Canine Leishmaniasis in Southeastern Spain	73
Artículo 2. Changes in the population of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) vectors of leishmaniasis, and their relationship with the increase in temperature in South-East Spain	83
Artículo 3. Leishmaniosis en la provincia de Cádiz (sur de España): seroprevalencia y factores de riesgo de la leishmaniosis canina e incidencia en humanos	105
Artículo 4. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios	119
Artículo 5. Reliability of a quantitative <i>L. infantum</i> -specific PCR for the diagnosis of canine and human leishmaniasis	143
IV. DISCUSIÓN GENERAL	163
V. CONCLUSIONES	177
VI. ANEXO. MATERIAL Y MÉTODOS	179
VI.1. Los flebotomos	179
VI.2. El diagnóstico de la leishmaniosis	199
VII. BIBLIOGRAFÍA	227

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Género *Leishmania* y leishmaniosis en España. Aspectos generales.

Leishmaniosis es la denominación que reciben un grupo de enfermedades infecciosas causadas por protozoos tripanosomátidos pertenecientes al género *Leishmania* Ross, 1903 (Gállego, 2004; World Health Organization “W.H.O”, 2004). Este género comprende un creciente número de especies, unas 30 en la actualidad, de las cuales alrededor de 20 pueden causar la enfermedad en humanos (Ashford, 2000).

En pleno siglo XXI esta enfermedad continúa siendo una de las más olvidadas, ya que afecta a regiones empobrecidas del planeta o países en vías de desarrollo. Según la W.H.O., se distribuye en zonas de clima cálido y templado, siendo endémica en 98 países o territorios y con una población en riesgo de 350 millones de personas. La incidencia anual estimada es de 2 millones de casos (0,5 millones de leishmaniosis visceral y 1,5 millones en su variante cutánea). Además, la leishmaniosis visceral ocasiona más de 50.000 muertes al año, cifra que sólo es superada por la malaria entre las parasitosis conocidas (W.H.O., 2010). Estos datos distan mucho de la incidencia anual dada por la W.H.O. en 1980, donde se hablaba de 400.000 casos (Chance, 1981).

Actualmente se acepta un importante déficit en lo relativo a los casos notificados (Gállego, 2004), siendo éste uno de los factores condicionantes de que durante años las distintas administraciones hayan considerado que la leishmaniosis representa un problema de baja prioridad. Otros inductores socio-económicos de esta errónea percepción han sido los siguientes (Desjeux, 1996; Desjeux y Alvar, 2003; W.H.O., 2004):

1. Aparición principalmente en regiones periurbanas alejadas de los centros de gobierno, y distribución parcheada de los puntos de transmisión.
2. Existencia de otros problemas de salud pública de mayor magnitud.
3. Desconocimiento de cuáles serían los planes de actuación más eficaces.

4. Las comunidades más afectadas ignoran la importancia de la disponibilidad de un diagnóstico y tratamiento eficaces. En muchos casos la enfermedad no se diagnostica por falta de facilidades médicas y técnicas, y no es tratada por escasez o falta de los medicamentos apropiados. La mayoría de los datos oficiales proceden de la detección pasiva de los casos.
5. Es una Enfermedad de Declaración Obligatoria (E.D.O.) en sólo 40 países de los 80 afectados. El reconocimiento oficial de esta enfermedad como E.D.O. compromete a las autoridades que lo aceptan a aportar medidas para su prevención y control.

En España, la leishmaniosis ha sido considerada E.D.O. desde 1982 (B.O. E. nº 13, 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). En la Comunidad Autónoma Andaluza esta enfermedad continúa siendo E.D.O. (B.O.J.A. nº 4, 2009), aunque la mayor parte de los datos oficialmente registrados se deben a una detección pasiva de los casos.

A pesar de estos datos, para la especie responsable de la leishmaniosis en la Península Ibérica (*Leishmania infantum*) el hombre no actúa como hospedador reservorio, y el principal animal implicado en el mantenimiento y distribución de *L. infantum* es el perro doméstico (*Canis familiaris*), cuya relación con la enfermedad ha sido estudiada durante años (Alvar et al., 2004). Según Ashford (1997), el perro es el único animal doméstico capaz de mantener poblaciones zoonóticas de *Leishmania*, aunque diversos trabajos han puesto de manifiesto que en España existen otros mamíferos susceptibles de ser infectados por *L. infantum* (Morillas-Márquez et al., 1985; Ashford, 1998; Desjeux, 2001; Portús et al., 2002; Sobrino et al., 2008), habiendo adquirido especial interés los casos de leishmaniosis felina (Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Martín-Sánchez et al., 2007).

Las cifras de leishmaniosis canina obtenidas tanto en la Cuenca Mediterránea como 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; Miró et al., 2007; Gálvez et al., 2010), indican que nos encontramos ante una enfermedad de gran impacto en términos de sanidad animal (Gallego, 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. Dicha subestimación en el número de casos en perros podría estar relacionada con los siguientes aspectos:

1. La mayoría de los perros infectados (en torno al 50%) se mantienen asintomáticos durante largos periodos de tiempo o incluso durante toda su vida (Cabral et al., 1992; Solano-Gallego et al., 2001; Moreno y Alvar, 2002), y cuando la sintomatología es patente, se asemeja mucho a la causada por otras patologías (Alvar et al., 2004).
2. En Madrid se han registrado prevalencias de leishmaniosis en perros vagabundos superiores a las obtenidas con los perros domésticos (Miró et al., 2007). La importancia de este dato radica en que estos animales escapan al control censal y sanitario de las administraciones. Moreno y Alvar (2002) han estimado que los perros vagabundos representaban en el año 2002 al 22,2% de la población canina total española, lo cual aumenta la dimensión del problema.
3. Limitaciones relativas al método de diagnóstico utilizado (véase apartado I.9 relativo al diagnóstico de la leishmaniosis). Aunque las técnicas serológicas, basadas en la detección/cuantificación de la respuesta inmune humoral, ofrecen gran información sobre el historial de contactos parasito-hospedador o sobre la evolución de la enfermedad (en determinados casos), no podemos olvidar que la respuesta inmune del hospedador se encuentra condicionada por una serie de factores innatos a los animales, a la propia infección o incluso relacionados con el carácter estacional de la actividad del vector que podrían alterar los resultados del diagnóstico y por tanto a la percepción real de la enfermedad (Pinelli et al., 1994; Acedo-Sánchez et al., 1998; Cabral et al., 1998; Nieto et al., 1999; Oliva et al., 2006; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Fernández-Bellón et al., 2008). Los métodos moleculares aplicados al diagnóstico de la leishmaniosis han

arrojado cifras de prevalencia muy superiores a las obtenidas mediante procedimientos serológicos (Martín-Sánchez et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2001; Martín-Sánchez et al., 2002; Fernández-Bellon et al., 2008; Chitimia et al., 2011).

Según varios autores, la prevalencia de la leishmaniosis humana es mayor en áreas donde la interacción entre el hombre y el reservorio doméstico del parásito (perro) es más intensa. También se ha encontrado cierta asociación con otros animales de establo como son mulos, cabras o gallinas, cuyo papel en la aparición de nuevos casos de leishmaniosis humana podría estar asociado a fenómenos de atracción y/o mantenimiento de las poblaciones de vectores, ya que proporcionarían un entorno ideal para la puesta de huevos y desarrollo larvario (Killick-Kendrick, 1987; Morillas et al., 1996; Rodrigues et al., 1999; Moreira et al., 2003; Miró et al., 2008; Bhattarai et al., 2010). En zonas donde la leishmaniosis canina es endémica los porcentajes de perros infectados podrían tener repercusión en la salud pública, viéndose especialmente afectadas las personas inmunodeprimidas (Solano-Gallego et al., 2001; Franco et al., 2011).

En las últimas seis décadas, el 10,7% de los casos relacionados con enfermedades infecciosas emergentes han sido causados por protozoos, habiéndose descrito que la mayor intensidad de eventos se han registrado en los últimos diez años. Del mismo modo, se ha observado un marcado aumento de los casos de enfermedades transmitidas por vectores (Jones et al., 2008). Varios autores mantienen la creencia de que el ampliamente debatido “cambio climático” podría guardar relación con estos incrementos (Colwell et al., 1998; Lafferty, 2009). La temperatura está incluida entre los parámetros medio-ambientales relacionados con dicho cambio, y sus variaciones podrían alterar tanto la densidad de los vectores como la propia capacidad vectorial de los mismos (López-Vélez y Molina-Moreno, 2005).

I.2. Clasificación taxonómica.

El agente causal de la leishmaniosis son un amplio grupo de protozoos mastigoforos o flagelados pertenecientes al género *Leishmania*. Los parásitos del orden *Kinetoplastida* se caracterizan por ser uninucleados con una mitocondria

única que ocupa gran parte de la estructura celular, y en cuyo interior se observa el ADN mitocondrial enrollado. Dicho ADN recibe el nombre de kinetoplasto (ADNk) y confiere su denominación a este orden (Gállego-Berenger, 2006). Las especies patógenas pertenecientes a los dos sub-géneros de *Leishmania*, *Leishmania* y *Viannia*, se diferencian entre sí por su emplazamiento en el aparato digestivo del vector (Lainson y Shaw, 1987). Como ocurre con el orden y sub-género, la clasificación inicial de *Leishmania* se ha basado en criterios ecológicos, como pueden ser el vector, distribución geográfica, tropismo o manifestaciones clínicas. Sin embargo, desde que estas especies han comenzado a ser analizadas mediante procedimientos moleculares y bioquímicos, el sistema de clasificación se ha apoyado en otros elementos como son los marcadores isoenzimáticos, o del ADN del kinetoplasto (kADN) (Bañuls et al., 2007). Así, la clasificación original de los sub-géneros realizada por Lainson y Shaw, (1987) ha sido posteriormente respaldada mediante análisis filogenético basado en las secuencias de ADN (Bañuls et al., 2007; Schönian et al., 2010).

Con todo ello, la W.H.O. (2010) ha clasificado a la especie *L. infantum*, Nicolle, 1908 como indica la tabla 1. En dicha clasificación, basada en la de Levine et al. (1980), se distingue entre *L. infantum* y *L. chagasi* Cunha y Chagas, 1937, aunque esta última ha sido considerada sinónima de *L. infantum* (Maurício et al., 2000), que habría sido introducida en el Nuevo Mundo en la época colonial.

Otros autores han actualizado la posición taxonómica del género *Leishmania*, de modo que quedaría encuadrado en el reino Protozoa, Phylum Euglenozoa, Clase Kinetoplastea (Cavalier-Smith, 1998; Cox, 2002; de-Meeûs y Renaud, 2002). Adl et al., (2005) consideran que Euglenozoa queda dentro del super-grupo Excavata.

Introducción

Sub-reino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Sub-phylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Sub-orden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae

Género

Leishmania

Sub-género	<i>Leishmania</i>	Viannia
-------------------	-------------------	---------

Complejo

L. donovani *L. tropica* *L. major* *L. aethiopica* *L. mexicana* *L. braziliensis* *L. guyanensis*

Especie

*L. chagasi** *L. killicki** *L. major* *L. aethiopica* *L. amazonensis* *L. braziliensis* *L. guyanensis*
L. donovani *L. tropica* *L. garnhami** *L. peruviana* *L. panamensis*
L. infantum *L. mexicana*
*L. pifanoi**
L. venezuelensis

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *L. infantum* (resaltada en negrita) incluida en la clasificación general de las especies patógenas de *Leishmania* descritas por la W.H.O. (2010). No se han incluido las especies dermatópicas del Sub-género *Viannia*; *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiiffi*, y *L. lindenbergi* por no estar claramente definida su posición taxonómica. *Estado de las especies en discusión.

I.3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Las especies del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida heteroxeno, con un hospedador vertebrado y otro invertebrado que a su vez cumple con la función vectorial. El artrópodo vector son los flebotomos (Diptera, Psychodoidea, Phlebotomidae), que están representados por las especies del género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, siendo por tanto estos segundos los agentes transmisores de *Leishmania* en España (especies del sub-género *Larroussius*: *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, véase apartado I.9.).

Al tratarse de parásitos pleomórficos o polimórficos presentan distintas fases en su ciclo de vida que se diferencian principalmente por la presencia o ausencia (parcial) de flagelo, así como en la disposición y estructura del kinetoplasto y núcleo (Fig. 1 y 2). Morfológicamente se distinguen dos fases bien definidas denominadas amastigotes y promastigotes; aunque durante su evolución dentro del hospedador invertebrado aparecen una serie de estadios intermedios (indicados a continuación).

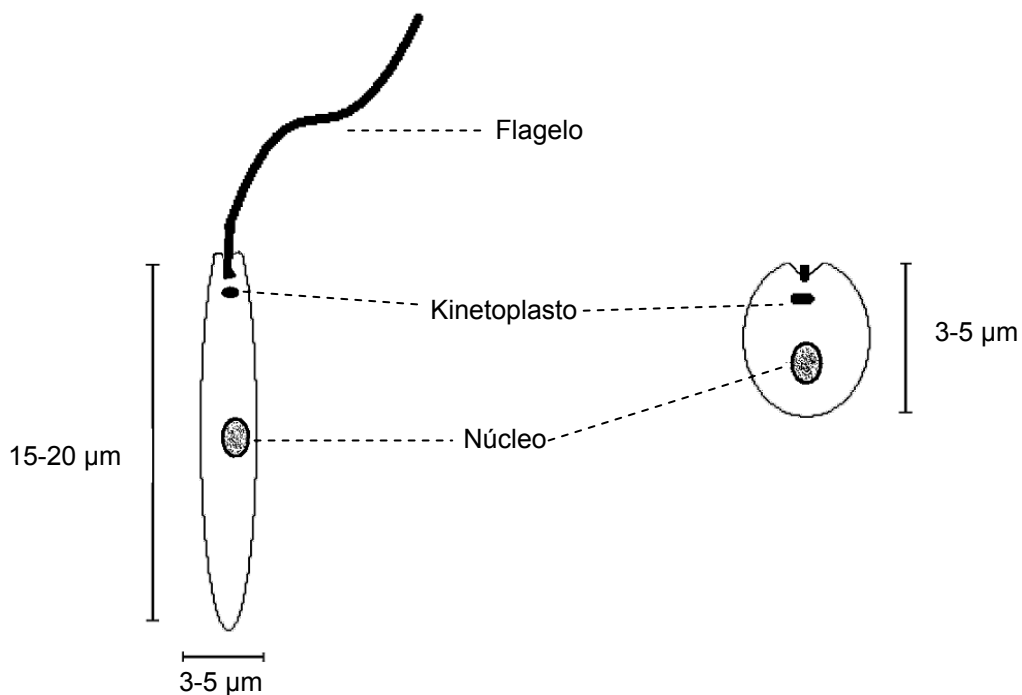


Figura 1. Forma promastigote.

Figura 2. Forma amastigote.

Introducción

En el hospedador invertebrado: La hembra del flebotomo ingurgita la sangre del hospedador vertebrado que contiene los macrófagos con las formas amastigote de *Leishmania* en su interior; una vez en la luz del intestino medio del flebotomo, el protozoo sale del macrófago para transformarse en promastigote procíclico (PP) y multiplicarse activamente. Estos PP atraviesan una membrana sintetizada entorno a la sangre ingerida (membrana peritrófica), y tras varios días se transforman en promastigotes nectomonas que migrarán hasta la valva estomodeal. A continuación sufren otra serie de transformaciones intermedias (leptomonas/ haptomonas) que finalizan con la fase infectiva para el hospedador vertebrado, conocida como promastigote metacíclico, la cual se sitúa en la región anterior del intestino (valva estomodeal), faringe y probóscide del vector. El parásito pasa al hospedador vertebrado a través de la picadura del flebotomo, sin que se sepa con exactitud cómo el parásito sale en dirección contraria al flujo sanguíneo ingerido; aunque la mayoría de las teorías hablan de obstaculización en la entrada de sangre por acumulación de parásitos, o deterioro del sistema de alimentación del flebotomo (Schlein, 1993; Bates, 2007).

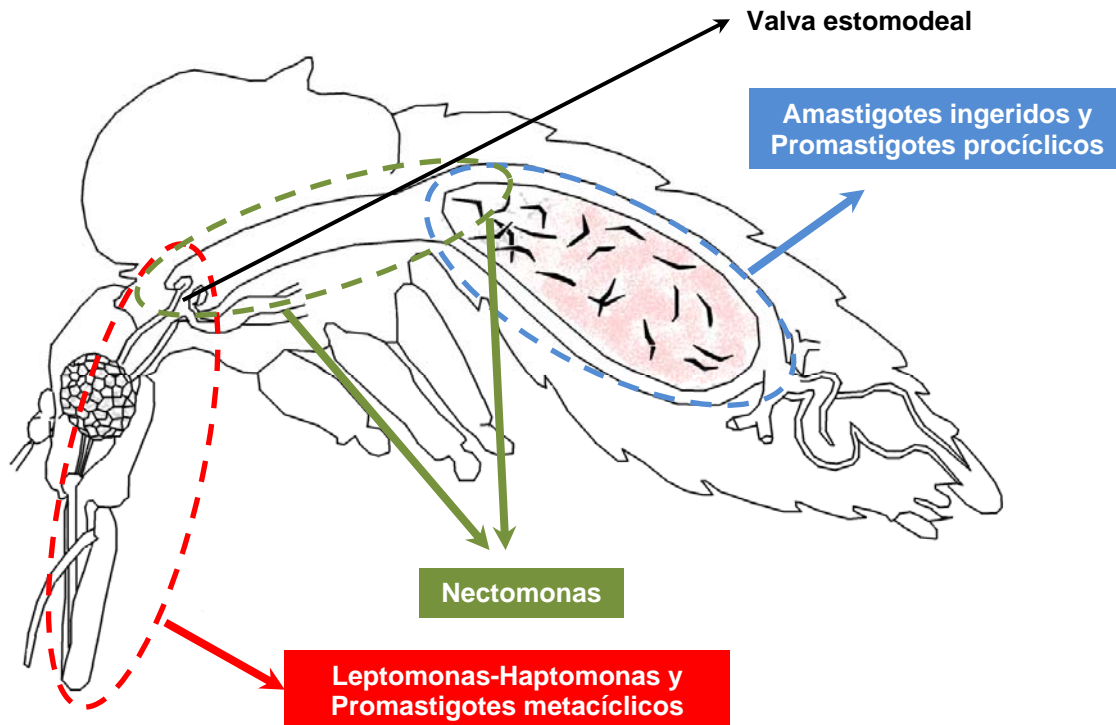


Figura 3. Transformaciones sufridas por *Leishmania* dentro del hospedador invertebrado. Tomada de Schlein (1993). Modificada por el autor.

En el hospedador vertebrado: Los parásitos son fagocitados por los macrófagos y células dendríticas de la dermis, en cuyo interior quedan englobados en vacuolas parasitóforas que les permiten superar los procesos digestivos post-fagocíticos. El parásito pasa a la forma amastigote y mediante divisiones binarias se multiplica activamente hasta que el macrófago estalla y su contenido es liberado al exterior. Al mismo tiempo, el trauma mecánico propio de la picadura induce la llegada de neutrófilos a la zona, englobando a los promastigotes metacíclicos, que 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. 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 (Gállego-Berenger, 2006; Kaye y Scott, 2011).

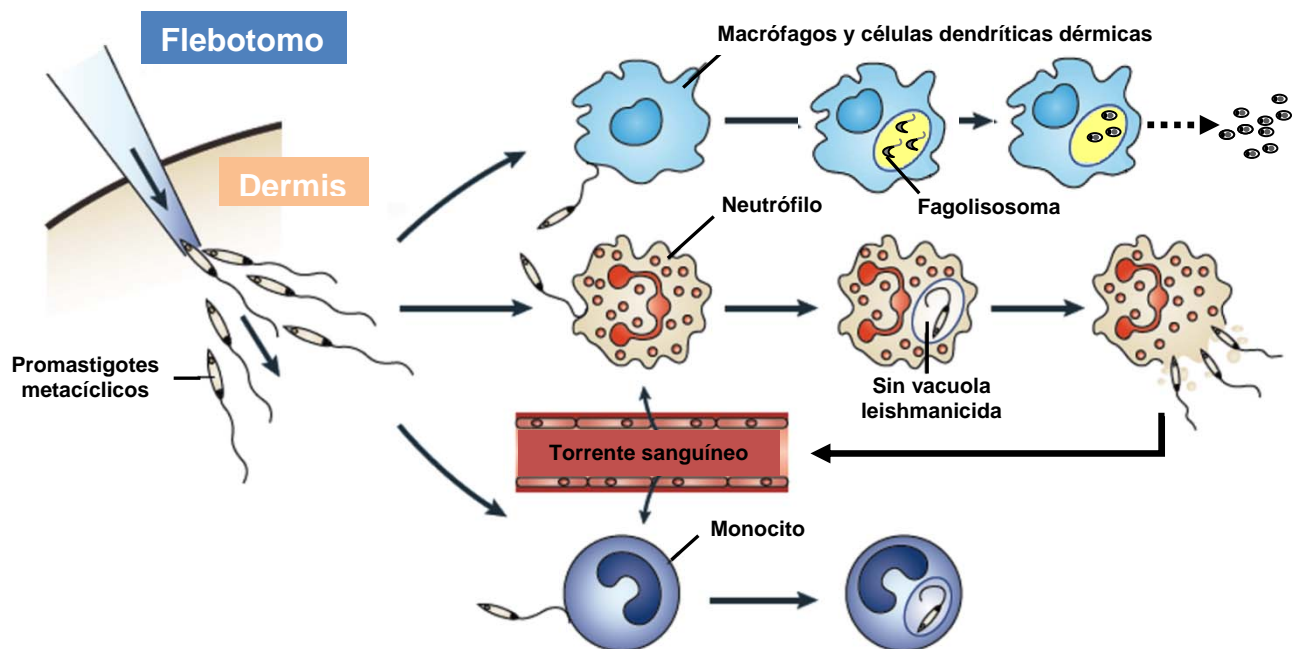


Figura 4. Líneas celulares implicadas en la interacción hospedador-vector. Tomada de Kaye y Scott (2011). Modificada por el autor.

Dado que los macrófagos son células especializadas en la destrucción de los patógenos invasores e iniciación de la respuesta inmune, 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 varias funciones del macrófago, como son la activación del óxido nítrico o ciertas citocinas relacionadas con el inicio de la respuesta inmune; también se han descrito modificaciones en la estructura y composición de ciertas proteínas de superficie, así como la incorporación de lípidos de membrana procedentes de las células hospedadoras con función mimética (Alexander et al., 1999; Olivier et al., 2005).

I.4. Eco-epidemiología de la leishmaniosis por *Leishmania infantum*.

Las leishmaniosis quedan incluidas en 4 grandes entidades eco-epidemiológicas: leishmaniosis cutáneas zoonóticas y antroponóticas, y viscerales zoonóticas y antroponóticas. En las variantes antroponóticas el hombre es la única fuente infectiva para el vector, mientras que en las zoonosis los animales juegan un papel fundamental en la diseminación y mantenimiento de la enfermedad (Desjeux, 2001).

Entre las leishmaniosis zoonóticas, las más extendidas son las formas viscerales y cutáneas causadas por *L. infantum* (Gramiccia y Gradoni, 2005), donde los cánidos cumplen con todos los requisitos necesarios para ser reservorios eficientes del agente etiológico de la enfermedad. El perro doméstico (*Canis familiaris*) ha sido incriminado como principal reservorio en todos los continentes donde se han referido casos humanos de leishmaniosis por *L. infantum* (Latino América, Cuenca Mediterránea y Asia). Algunos autores (Dantas-Torres, 2007; Quinnell y Courtenay, 2009; Maia y Campino, 2011) han señalado varias razones por las que el perro ocuparía este lugar en el ciclo biológico de *L. infantum*:

- ✓ Suelen vivir cerca o dentro de las viviendas humanas (ambientes peri-domésticos), favoreciéndose el ciclo doméstico de transmisión (Miró et al., 2008).

- ✓ Elevada susceptibilidad para ser infectado por *L. infantum*.
- ✓ Intensa parasitación cutánea por amastigotes intracelulares de *Leishmania*, incrementando la posibilidad de transmisión.
- ✓ Posibilidad de mantenerse infectados durante años o toda su vida sin mostrar signos clínicos de infección (Alvar et al., 2004), habiéndose descrito que estos perros asintomáticos son capaces de infectar proporciones similares de flebotomos que aquellos con sintomatología compatible con leishmaniosis (Quinnell y Courtenay, 2009).
- ✓ La caracterización de cepas de *L. infantum* por electroforesis de isoenzimas ha revelado que el zimodemo MON-1, responsable de la mayoría de los casos de leishmaniosis visceral en la Cuenca Mediterránea, también es predominante en los perros (Martín-Sánchez et al., 2004; Pratlong et al., 2004).

Otros animales, tanto domésticos como salvajes, han sido estudiados en la búsqueda de nuevos reservorios potenciales de *L. infantum*. Entre los primeros, los gatos (*Felis catus*) han adquirido especial interés por el incremento de las notificaciones registradas en España, Francia e Italia (Ozon et al., 1998; Poli et al., 2002; Pennisi et al., 2004; Martín-Sánchez et al., 2007; Tabar et al., 2008). Al igual que ocurre con el reservorio canino, estos animales son i) susceptibles de ser infectados por *L. infantum*, manteniéndose en la mayoría de los casos asintomáticos; ii) fuente de alimento (sangre) para los vectores de *L. infantum*, pudiendo llegar a infectarlos (Maroli et al., 2007); iii) localizables en zonas donde el ciclo de transmisión doméstico y/o peri-doméstico de *L. infantum* es común. Sin embargo, su papel como reservorios no se ha determinado de forma concluyente; Maia y Campino (2011) han indicado que son necesarios estudios más extensivos para conocer la prevalencia real de la leishmaniosis felina, y comparar su capacidad como reservorios con la de los hospedadores caninos. En España, los estudios realizados por Martín-Sánchez et al. (2007), Solano-Gallego et al. (2007) y Portús et al. (2002) han obtenido seroprevalencias de leishmaniosis felina que van desde el 1,7% al 6,29%; sin embargo al emplear métodos moleculares Martín-Sánchez et al. (2007) han alcanzado valores del 26,1%. Estos últimos autores han sugerido un posible papel protector de la respuesta inmune humoral en los gatos infectados por *Leishmania*.

Introducción

También se han descrito casos equinos de leishmaniosis por *L. infantum* en España (Solano-Gallego et al., 2003; Fernández-Bellón et al., 2006), Portugal (Rolão et al., 2005) y Alemania (Koehler et al., 2002), así como casos en caprinos y ovinos donde los bajos títulos de anticuerpos obtenidos hacen pensar en un intenso historial de contacto con los vectores sin establecimiento de la infección (Fisa et al., 1999; Portús et al., 2002).

La posibilidad de que ciertos animales pertenecientes a entornos silvestres puedan actuar como reservorios no domésticos de *L. infantum* ha llevado en los últimos años al estudio de estos hábitats. Como se aprecia en la tabla 2, los zorros (*Vulpes vulpes*) han sido referidos como posibles reservorios en diversos estudios realizados en España, Francia, Italia y Portugal.

País	Área	Técnica	Prevalencia (%)	Autores	
España	Cataluña (Priorat)	Dot-ELISA	1/67	1,5%	Fisa et al. (1999)
España	Guadalajara	PCR-electroforesis	50/67	74,6%	Criado-Fornelio et al. (2000)
España	Cataluña	Dot-ELISA	3/112	2,7%	Portús et al. (2002)
España	Región cantábrica	PCR-RFLP	8/38	21%	Sobrino et al. (2008)
España	Castilla y León	PCR	1/1	*100%	Sobrino et al. (2008)
España	Aragón	PCR	3/60	5%	Sobrino et al. (2008)
España	Centro peninsular	PCR	9/40	22,5%	Sobrino et al. (2008)
España	Huelva	PCR	1/12	8,3%	Sobrino et al. (2008)
Francia	Cévennes	Aislamiento	2/99	2 %	Rioux et al. (1968)
Italia	Liguria	IFI	5/50	10%	Mancianti et al. (1994)
Italia	Campania	PCR-electroforesis	20/50	40%	Dipineto et al. (2007)
Italia	Pisa	PCR-electroforesis	48/92	52,2%	Verin et al. (2010)
Portugal	Alto-Douro/ Arrábida	DAT-IFI	3/5	*60%	Semião-Santos et al. (1996)

Tabla 2. Leishmaniosis vulpina (*Vulpes vulpes*) presumiblemente por *L. infantum* en las últimas dos décadas. *Pocas muestras analizadas.

Portús et al. (2002) han encontrado martas (*Martes martes*), tejones (*Meles meles*), ginetas (*Geneta geneta*) y algunos roedores (*Mus spretus* y *Apodemus sylvaticus*) con títulos bajos de anticuerpos. Morillas-Márquez et al. (1985) aíslan el parásito de ratas (*Rattus Rattus*) capturadas en Granada y lo caracterizan por isoenzimas como *L. infantum* MON-1. Además, Sobrino et al. (2008) han detectado ADN de *L. infantum* en lobos (*Canis lupus*), mangostas (*Herpestes ichneumon*), ginetas, y lince ibérico (*Lynx pardinus*).

Tradicionalmente las zoonosis por *L. infantum* han estado vinculadas con el medio rural, pero con los años se ha registrado una adaptación progresiva al entorno urbano. Entre las causas de este fenómeno se encuentran las necesidades del progreso socio-económico, provocando nuevos flujos migratorios desde el campo a las ciudades (Desjeux, 2001). Por el contrario, la presión humana ha llevado a la ocupación de regiones peri-urbanas, rurales o incluso selváticas, donde la enfermedad es originalmente endémica. Este sería el caso de *L. infantum* (= *L. chagasi*) en Brasil, donde estos desplazamientos han llevado a la formación de asentamientos conocidos como “favellas”, en los que confluyen todas las condiciones necesarias para el desarrollo de la enfermedad (Desjeux, 2004). De este modo, el ciclo natural de *L. infantum* habría quedado “parcialmente domesticado” por la acción y efecto de la actividad humana.

En los países de la cuenca mediterránea, los casos de contacto con el hospedador humano se han centrado tradicionalmente en la población infantil, y la malnutrición se citaba entre los principales factores de riesgo (Sanchis-Marín et al., 1986; Acedo-Sánchez et al., 1996; Solano-Gallego y Baneth, 2008). Por otra parte, la susceptibilidad de los individuos adultos al parásito es baja y la mayoría de las infecciones en la población sana son asintomáticas, y a menudo autocurativas. Sin embargo, los estados de inmunodepresión pueden comprometer esta resistencia natural a la infección (Ashford et al., 2000; Gramiccia y Gradoni, 2005). Desde la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la leishmaniosis visceral humana por *L. infantum* experimentó una importante reemergencia motivada por la co-infección por ambos agentes (Desjeux y Alvar, 2003). Además, la intensificación de ciertas actividades sanitarias que inducen a la inmunosupresión, como son los trasplantes de órganos o tratamientos con quimioterápicos antineoplásicos, han contribuido a modificar los patrones epidemiológicos inicialmente aceptados (Ashford, 1998) y así, el 75% de los casos notificados en Europa a finales de la década de los 90 correspondieron a personas adultas (Alvar et al., 1997).

La detección de casos de transmisión autóctona de *L. infantum* en latitudes donde los vectores aparecen en baja proporción o incluso están ausentes (Díaz-Espiñeira y Slappendel, 1997) ha llevado a pensar en la posible existencia de

rutas alternativas de transmisión. Algunas han sido demostradas de forma experimental, como son la transmisión congénita humana (Pagliano et al., 2005; Boehme et al., 2006) y canina (Rosypal et al., 2005), a través de trasplantes de órganos en humanos (Basset et al., 2005; Antinori et al., 2008), o vía transfusiones de sangre tanto en humanos (Le-Fichoux et al., 1999) como en perros (de-Freitas et al., 2006). También se ha comprobado que los perros pueden infectar a otros vectores no flebotominos como *Rhipicephalus sanguineus* o *Ctenocephalides felis* (Ferreira et al., 2009; Colombo et al., 2011; Dantas-Torres, 2011), aunque su capacidad para cerrar el ciclo infectando a otros perros no ha sido demostrada. También se han incriminado dípteros de la familia Ceratopogonidae (género *Forcipomyia*, sub-género *Lasiohelea*) como vectores potenciales de *Leishmania* en Australia (Dougall et al., 2011).

Por último, entre los usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) se ha originado una forma de transferencia que podría superar en relevancia a las anteriores. En estos casos las jeringuillas compartidas han asumido el papel vectorial del flebotomo, y la transmisión paralela entre pacientes VIH del virus inmunosupresor podría actuar sinérgicamente, incrementando el riesgo de desarrollar la infección parasitaria (Pineda et al., 2001; Moreno y Alvar, 2002; Morillas-Márquez et al., 2002). A su vez, la propia infección por *Leishmania* ya instaurada podría inducir a la progresión del VIH (Alvar et al., 1997). Según la W.H.O, el 81% de los casos de coinfección VIH-*Leishmania* notificados en España hasta el año 2001 fueron en UDVP (Desjeux y Alvar, 2003).

Introducción

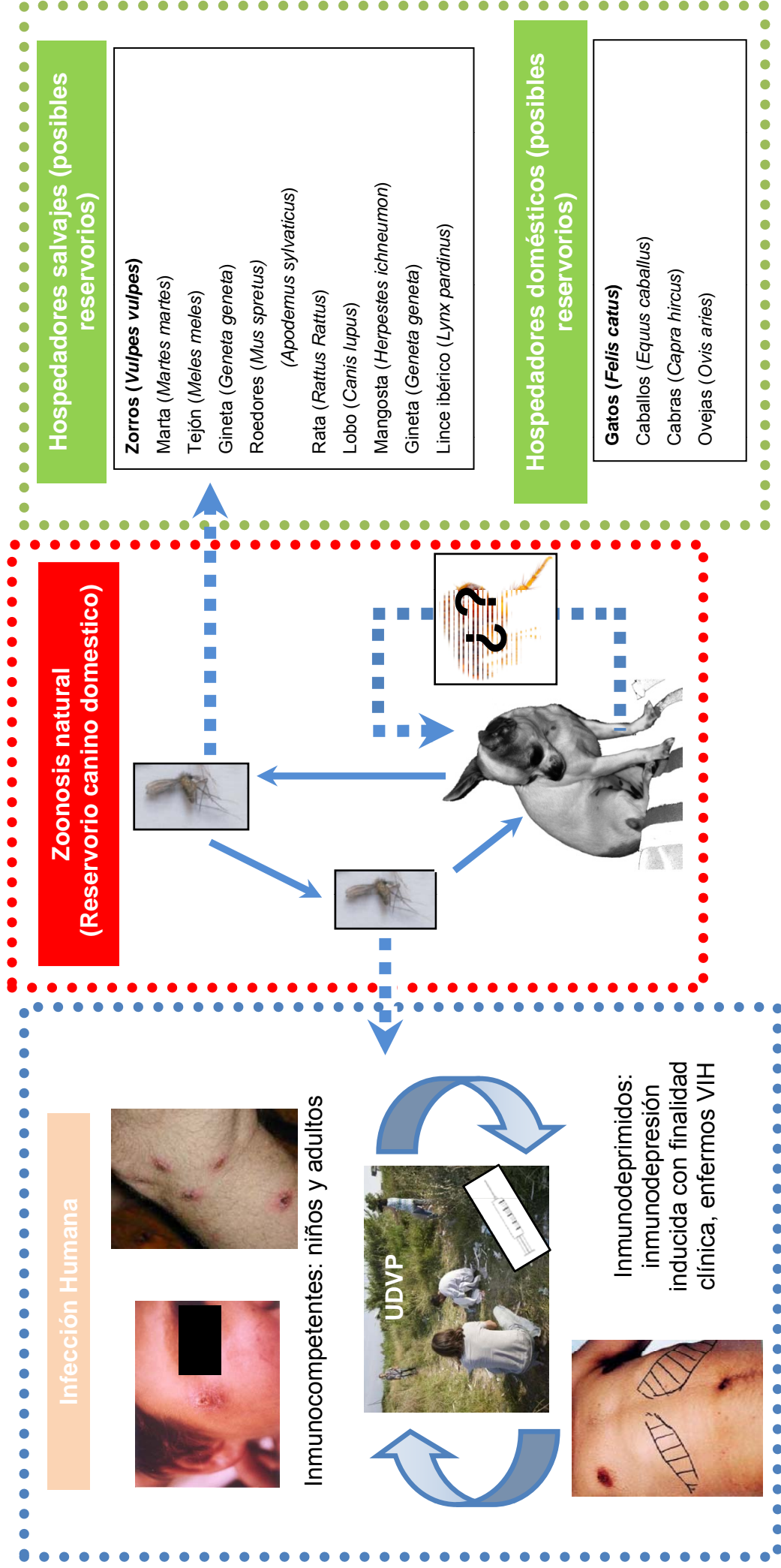


Figura 5. Epidemiología de *L. infantum*. UDVP, usuarios de drogas por vía parenteral (imagen tomada de www.publico.es). Imagen de leishmaniosis cutánea en niño tomada de Alcalde-Alonso (1988).

I.5. Leishmaniosis en la Cuenca Mediterránea.

En un estudio realizado por Rioux para la W.H.O. en 1982, el autor indicaba que en los focos de leishmaniosis del Sur de Francia y Pirineos Orientales las dos principales formas clínicas (cutáneas y viscerales) de la leishmaniosis se presentaban con similar frecuencia. Pocos años después, en 1985, el propio autor indicaba que la variante cutánea de la leishmaniosis por *L. infantum* era una forma clínica rara y esporádica en esta región (Rioux et al., 1985). En la actualidad se sabe que *L. infantum* es la causa más frecuente de leishmaniosis cutánea en los países de la Cuenca Mediterránea. La ratio leishmaniosis cutánea/visceral continúa siendo desconocida, ya que las lesiones provocadas por la variedad cutánea no suelen tener especial repercusión clínica y son autocurativas, pasando desapercibidas en muchas ocasiones por su similitud con otras infecciones microbianas o fúngicas (Dowlati y Pharm, 1996; W.H.O., 2010).

En cuanto a la leishmaniosis visceral humana, su notificación es obligatoria en Grecia, Italia y Portugal, aunque no en Francia. En España sólo se comunican los casos registrados en 12 de las 17 comunidades autónomas (Dujardin et al., 2008). Esta falta de consenso no favorece la detección de nuevos casos en un entorno de tan amplia distribución como es la Cuenca Mediterránea (véase tabla 3), y se agrava al considerar que hay regiones no endémicas en el norte de Italia, donde más del 50% de los individuos aparentemente sanos han resultado positivos al diagnóstico molecular (Biglino et al., 2009).

Forma clínica	Países con casos notificados
Leishmaniosis visceral	Albania, Argelia, Bosnia, Bulgaria, Croacia, Chipre, Egipto, Eslovenia, España, Francia, Grecia, Israel, Italia, Líbano, Malta, Montenegro, Marruecos, Portugal, Rumanía, Siria, Túnez, Turquía, Libia
Leishmaniosis cutánea	Albania, Argelia, Bosnia, Bulgaria, Croacia, Chipre, Eslovenia, España, Francia, Grecia, Israel, Italia, Líbano, Malta, Marruecos, Portugal, Túnez, Turquía

Tabla 3. Distribución de la leishmaniosis por *L. infantum* en la Cuenca Mediterránea y países adyacentes. Tomada de W.H.O. (2010).

La importancia atribuida a la leishmaniosis canina por *L. infantum* supera sobremanera a la percepción que se ha creado de la leishmaniosis humana. En el sur de Europa esta patología es considerada como una de las principales causas de muerte en cánidos con seroprevalencias que van del 10% al 40%, y los profesionales veterinarios son conscientes de su importancia (Bettini y Gradoni, 1986; Dujardin et al., 2008). Las estimaciones más conservadoras hablan del 16,7% de infección sobre el total de la población canina en la Europa Mediterránea (Moreno y Alvar, 2002). No obstante, su repercusión no quedaría restringida al ámbito de la sanidad animal, dado que estos grupos de cánidos infectados podrían contribuir a la expansión de la enfermedad en humanos. Por ello, el reservorio canino siempre ha estado presente en las estrategias de control de estas leishmaniosis zoonóticas, habiéndose propuesto medidas como el sacrificio, el tratamiento farmacológico o empleo de collares impregnados en agentes insecticidas para evitar la acción de los vectores (Ashford, 1996; Desjeux, 1996; Ashford, 1998). En los países de la Europa Mediterránea, el sacrificio de los animales no ha tenido buena acogida por motivos éticos, aunque en China, la combinación de esta medida con el control de los vectores redujo de forma considerable la incidencia de la enfermedad (Zhi-Biao, 1989). En Brasil, estas medidas sólo tuvieron efecto transitorio y la incidencia humana de la enfermedad ha aumentado en los últimos años (Oliveira et al., 2008).

Los programas de control realizados en países europeos han sido escasos. En la Isla de Elba (Italia) se consiguió reducir la incidencia de la leishmaniosis canina del 12,4% al 4,6% mediante el tratamiento farmacológico de los animales, aunque estas campañas fueron menos eficaces cuando los perros mostraban sintomatología manifiesta (Mancianti et al., 1988; Gradoni et al., 1988). Otra medida, también llevada a cabo en Italia, ha sido el control de la actividad vectorial mediante el empleo de collares impregnados en deltametrina. Los resultados de este segundo estudio indican que el uso de los collares es mucho más eficaz en zonas de elevada endemicidad y durante las estaciones de mayor transmisión (Maroli et al., 2001).

Estos datos indican que cualquier programa de control, enfocado hacia la leishmaniosis canina o humana, requiere del conocimiento de la prevalencia/incidencia de la enfermedad en la zona (Dantas-Torres, 2007), tanto antes de implementarlo como *a posteriori*. Esto sólo es posible empleando métodos de diagnóstico eficientes que garanticen que los resultados obtenidos se aproximen de forma veraz a la situación de la enfermedad; más aun cuando los estudios han demostrado que el grado de endemidad de la zona podría repercutir sobre el impacto de las medidas aplicadas (Maroli et al., 2001; W.H.O., 2004).

I.5.1. Leishmaniosis humana en España.

El primer caso de leishmaniosis visceral humana del que se tiene constancia en la Península Ibérica se describió por Pittaluga (1912) en un niño de Tarragona. En 1914, Camacho-Alejandro y Fernández-Martínez realizaron las primeras descripciones de la variante cutánea de la enfermedad o “botón de Oriente” en Andalucía (Botet-Fregola y Portús-Vinyeta, 1993). Desde entonces, se comenzó a registrar un constante aunque no elevado número de casos.

Durante la época comprendida entre 1982 y 1996, la incorporación de la leishmaniosis al grupo de las E.D.O. elevó el número de casos al centenar de denuncias anuales (Morillas et al., 1995). En este periodo de tiempo se notificaron en España un total de 1574 casos acumulados de leishmaniosis (Alvar, 1997).

A principios de la década de los 90 la leishmaniosis comenzó a experimentar una importante re-emergencia, suscitada por la ya mencionada coinfección con el VIH. En el sur-oeste de Europa, el 57,5% (1099/1911) de los casos de VIH-*Leishmania* notificados por la W.H.O. a principios del año 2001 correspondieron al territorio español (Desjeux y Alvar, 2003). Gil-Prieto et al. (2011) realizaron un estudio de los registros de hospitalizaciones por leishmaniosis entre los años 1997 y 2008 utilizando el Sistema de Información Nacional de Datos Hospitalarios, dependiente del Ministerio de Sanidad. Del estudio se deriva que en 2028 casos la principal causa de hospitalización fue la leishmaniosis. Valcárcel et al. (2008), empleando la misma base de datos nacional entre los años 1999 y 2003, obtuvieron resultados similares en el mismo

periodo. Ambos grupos de autores coinciden en que las mayores incidencias se han registrado en Madrid y las Comunidades Autónomas de influencia Mediterránea, aunque Valcárcel et al. (2008) también han incluido a Castilla-La Mancha entre las más afectadas.

La introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad en 1997 ha reducido la incidencia de la leishmaniosis visceral en el sur de Europa. Aun así, es muy probable que los casos de coinfección VIH-*Leishmania* estén siendo subestimados, ya que a partir de 1997 la leishmaniosis dejó de ser considerada E.D.O., y nunca se ha encontrado incluida en el grupo de enfermedades oportunistas que informan sobre la evolución del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Cruz et al., 2006). Según Pineda et al. (1998), la proporción de pacientes VIH-1 con leishmaniosis visceral subclínica es elevada (41%), y los casos sintomáticos aparecen en individuos que sufren una profunda inmunodepresión. Por tanto, la recuperación del estado inmune asociada al tratamiento antirretroviral podría incrementar el porcentaje de pacientes con leishmaniosis visceral asintomática.

Como se observa en la tabla 4, la mayoría de los casos recopilados proceden de la detección efectuada por la W.H.O., detección pasiva de casos en hospitales, o de estudios realizados por diversas entidades públicas con finalidad epidemiológica o investigadora (grupos de investigación universitarios y otras instituciones). Estas y otras publicaciones han confirmado que la búsqueda activa de pacientes infectados ofrece valores muy superiores a los emitidos en boletines epidemiológicos, dato que coincide con el intenso historial de contactos parásito/humanos registrado en diversos puntos del sur de Andalucía mediante intradermoreacción de Montenegro (Acedo-Sánchez et al., 1996; Morillas et al., 1996; Sanchis-Marín et al., 1997).

Introducción

Región	Año/s	Casos totales de Leishmaniosis	Coinfección HIV-Leishmania	Referencia
Alicante	1997-1998	41 I.D.R.	-	Moral et al. (2002)
Almería	1992-1993	33 I.D.R.	-	Sanchis-Marín et al. (1997)
Almería-Granada-Málaga	1989-1991	10 C.I.	-	Martín-Sánchez et al. (1996)
Andalucía	1993-1997	-	32 E.H.	*Pineda et al. (1998)
Cádiz	2004	1 C.C.	-	Carmona-Espinazo et al. (2004)
Castellón	1973-1989	39 E.H.	-	Arnedo-Pena et al. (1994)
Castilla-León	1995-1996	241 E.H.	139 E.H.	Garrote et al. (2004)
Cataluña	1986-1993	-	13 C.I.	Pratlong et al. (1995)
Cataluña	1982-2004	740 B.O.	120 L.P.	*Portús et al. (2007)
Cataluña	1991	2 C.C.	-	Gállego et al. (2001)
Cataluña-Baleares	2001-2007	13 C.C.	-	Marín-Ezquerria et al. (2009)
Granada	1991	566 I.D.R.	-	Acedo-Sánchez et al. (1996)
Granada-Sevilla-Alicante	-	27 E.H.	24 E.H.	Martín-Sánchez et al. (2002)
Huelva	1995-1997	12 I.D.R.	1 E.H.	Lepe et al. (2000)
Madrid	1987-1995	66 E.H.	56 E.H.	*López-Vélez et al. (1998)
Málaga	1992	533 I.D.R.	-	Morillas et al. (1996)
Menorca	1983-1991	3 C.C.	-	Portús et al. (1994)
Murcia	2009	-	1 C.C.	Egea-Valenzuela et al. (2009)
Navarra	1976-1997	33 B.O.	2 B.O.	Sesma y Barricarte (1997)
Sevilla	1993-1998	-	19 E.H.	*de-la-Rosa et al. (2001)
Sevilla	1998-1999	13 E.H.	-	*Pineda et al. (2001)
Sevilla	1989-2000	-	21 E.H.	*de-la-Rosa et al. (2002)
Toledo	1992-2004	131 E.H.	3 E.H.	García-Almagro (2005)
Valencia	1986-1993	-	3 C.I.	Pratlong et al. (1995)
Valencia	1982-1989	132 E.H.	-	Arnedo-Pena et al. (1994)
España	1990-1998	-	835 W.H.O.	Desjeux (1999)
España	1996-1998	-	412 W.H.O.	Desjeux (1999)
España	1986-2000	-	32 C.I.	Pratlong y Alvar (2003)
España	1994-2001	-	1099 W.H.O.	Desjeux y Alvar (2003)
España	1999-2003	786 E.H.	472 E.H.	Valcárcel et al. (2008)
España	1997-2008	2028 E.H.	683 E.H.	Gil-Prieto et al. (2011)
España	1982-1989	704 E.H.	-	Arnedo-Pena et al. (1994)

Tabla 4. Breve resumen de casos citados de leishmaniosis humana e individuos con Intradermoreacción positiva (I.D.R.). Datos referidos a los años comprendidos entre 1973 y 2008, en España y por provincias. C.C., Notificación de Caso/s clínico/s; I.D.R., Encuesta mediante Intradermoreacción de Montenegro; W.H.O. Casos notificados a la Organización Mundial de la Salud; E.H., Estudio de casos en servicios hospitalarios o revisión de historiales clínicos de pacientes; C.I. Caracterización isoenzimática de cepas; B.O., Boletines oficiales; L.P., Casos registrados en laboratorio/s de parasitología. *Colaboración entre departamentos universitarios de parasitología y hospitales.

I.5.2. Leishmaniosis canina en España.

La leishmaniosis canina fue descrita por primera vez en el año 1913 por Pittaluga en Tortosa (Tarragona) (Botet-Fregola y Portús-Vinyeta, 1993). En 1933, Rivera-Bandrés, bajo la dirección del profesor Pittaluga confirmó la existencia de un foco de leishmaniosis canina en Madrid. Entre los años 1935-1936 Sánchez-Botija obtuvo una prevalencia del 7,9% mediante el examen de frotis de órganos hematopoyéticos y análisis histológico de muestras procedentes de 2230 perros de la capital española. Además realizó una descripción detallada de los aspectos clínicos de la enfermedad, donde se mencionó por primera vez la variante críptica de la leishmaniosis canina, citada por el autor como “infecciones latentes” (Sánchez-Botija, 1936).

A partir de la década de los 80 se han realizado un amplio número de estudios que han permitido determinar la prevalencia de leishmaniosis canina en diversas provincias de España (tabla 5). Al contrario que ocurre con la leishmaniosis humana no se han emitido demasiados datos oficiales sobre la enfermedad (Portús et al., 2007). La mayoría de estas encuestas se basan en el empleo de métodos de diagnóstico serológicos (Solano-Gallego y Baneth, 2008), aunque como se observa en la tabla 5 no existe consenso en la selección de los umbrales de seropositividad, lo cual, sumado a las limitaciones propias de estas técnicas dificulta la comparación de los datos emitidos. Sin embargo, estos métodos cuentan con una serie de ventajas que se detallan en el siguiente apartado, y que los hacen adecuados para ofrecer una visión general de la enfermedad (Fig. 6).

Mediante el empleo de estas técnicas serológicas también se ha pretendido evaluar la existencia o no de asociaciones entre ciertas características de los perros y la seroprevalencia de la enfermedad. Las más analizadas han sido la edad, sexo o raza de los animales. El sexo ha resultado un parámetro determinante para algunos autores, destacando la mayor prevalencia registrada entre los machos (Castañeda et al., 1999; Fisa et al., 1999; Miranda et al., 2008), aunque para otros no ha sido representativo (Nieto et al. 1992; Amela et al., 1995; Acedo-Sánchez et al., 1996; Morillas et al., 1996; Amusatogui et al., 2004; Miró et

al., 2007). Respecto a la edad, algunos autores han descrito picos de seroprevalencia a partir de los 4 o 7 años (Fisa et al., 1999; Miró et al., 2007), otros han hallado estas mayores seroprevalencias en algún punto o rango situado entre los 3 a 6 años (Martínez-Cruz et al., 1990; Nieto et al., 1992; Miranda et al., 2008; Alonso et al., 2010), mientras que un último grupo han observado que la seroprevalencia en función de la edad podría presentar una distribución bimodal (Amela et al., 1995; Acedo-Sánchez et al., 1996; Gálvez et al., 2010). Las razas más susceptibles citadas han sido los Fox-terriers (Amela et al., 1995), German-shepherd y Rottweiler (Miranda et al., 2008). Estudios realizados por Solano-Gallego et al. (2000) en Mallorca han demostrado que los ibicencos de caza son capaces de desarrollar una respuesta inmune celular, protectora, superior a la que han mostrado otras razas caninas.

Otros parámetros analizados han sido la longitud del pelo, el tamaño de los animales, la aptitud o función realizada por los perros, o el hábitat, entendiendo como tal el carácter rural o urbano de la zona donde viven, o si pernoctan en el interior o exterior de recintos protegidos de la acción de los vectores (Brazal-García et al., 1990; Nieto et al., 1992; Acedo-Sánchez et al., 1996; Morillas et al., 1996; Fisa et al., 1999; Amusatogui et al., 2004; Alonso et al., 2010; Gálvez et al., 2010).

Introducción

Area geográfica	Año/s	Finalidad	Nº perros estudiados	Nº perros sintomáticos	Método (umbral)	Títulos dudosos	Prevalencia	Referencia
Alicante	1999	Epidemiológica	807	0 d.t.	ELISA (fabricante)	3%	19%	Alonso et al. (2010)
Alicante	-	Epidemiológica	1174	704 d.t.	IFI (1/160)	11,1%	23%	Brazal-García et al. (1990)
Almería	1989	Epidemiológica	988	ND	IFI (1/160)	67,6%	15,8%	Morillas-Márquez et al. (1992)
Almería	1992-1993	Epidemiológica	286	ND	IFI (1/160)	34,7%	4,5%	Sanchis-Marín et al. (1997)
Barcelona ciudad	-	Epidemiológica	617	ND	IFI (1/80)	7,3%	19,6%	Botet et al. (1987)
Barcelona provincia	1998-2002	C. poblaciones	390	390 d.t.	ELISA (ND)	ND	*100%	Miranda et al. (2008)
Cáceres	1988-1989	Epidemiológica	381	ND	IFI (1/80)	ND	14%	Nieto et al. (1992)
Castellón	1989-1990	Epidemiológica	136	ND	IFI (1/80)	16,1%	8,5%	Arnedo-Pena et al. (1994)
Castellón	1989	Vacunación m.	132	ND	IFI (1/80)	1,5%	0%	Arnedo-Pena et al. (1994)
Córdoba	1985-1988	Epidemiológica	540	ND	IFI (1/40) + ELISA (1/400)	ND	23,7%	Martínez-Cruz et al. (1990)
Galicia	-	Epidemiológica	479	13 d.p.	IFI (1/100)	ND	3,7%	Amusategui et al. (2004)
Granada	10 años	C. Isoenzimas	85	6 d.t.	-	ND	*100%	Martín-Sánchez et al. (2004)
Granada	1991	Epidemiológica	628	110 d.t.	IFI (1/160)	43%	5,3%	Acedo-Sánchez et al. (1996)
Granada	-	Epidemiológica	1503	ND	IFI (1/160)	ND	8,8%	Reyes-Magaña et al. (1988)
Granada-Jaén	1996	Seg. temporal	1374 m.p.d. 267	ND	IFI (1/160)	28%	16%	Acedo-Sánchez et al. (1998)
Huelva	-	C. Isoenzimas	9	9 d.t.	IFI (1/80)	ND	*100%	Martín-Sánchez et al. (1999)
Huelva	1995-1997	Epidemiológica	702	ND	IFI (1/160)	37,2%	6,7%	Lepe et al. (2000)
Madrid	1996-2006	Epidemiológica	1803	159 d.t.	IFI (1/100)	ND	7,8%	Miró et al. (2007)
Madrid	1992	Epidemiológica	591	ND	IFI (1/80)	14,4%	5,25%	Amela et al. (1995)
Madrid	-	Epidemiológica	235	39 d.t.	IFI (ND)	ND	4,7%	Castañeda et al. (1999)
Madrid	1992	Epidemiológica	1015	ND	IFI (ND)	ND	4,2%	Conesa-Gallego (1994)
Madrid	2006-2007	Epidemiológica	1076	29 d.p.	IFI (1/80)	ND	8,1%	Gálvez et al. (2010)
Málaga	1992	Epidemiológica	344	ND	IFI (1/160)	35,5%	34,6%	Morillas et al. (1996)
Mallorca	-	C. poblaciones	56	0 d.t.	H. R. Leishmanina	ND	66%	Solano-Gallego et al. (2000)
Mallorca	-	C. poblaciones	56	0 d.t.	ELISA (med.neg. + (3XD.E.))	ND	51,8%	Solano-Gallego et al. (2000)
Mallorca	-	C. poblaciones	56	0 d.t.	H. R. Leishmanina	ND	66%	Fernández-Bellón et al. (2005)
Mallorca	1999-2001	Seg. temporal	28	1 d.t.	H. R. Leishmanina	ND	71,4%	Solano-Gallego et al. (2005)
Mallorca	1999-2001	Seg. temporal	39	1 d.t.	ELISA (med.neg. + (4XD.E.))	ND	23%	Solano-Gallego et al. (2005)
Mallorca	-	Epidemiológica	100	13 d.t.	ELISA (med.neg. + (3XD.E.))	ND	26%	Solano-Gallego et al. (2001)

Introducción

Mallorca	-	Epidemiológica	100	13 d.t.	PCR-Electroforesis	ND	63%	Solano-Gallego et al. (2001)
Mallorca	2009	Epidemiológica	48	6 d.t.	Western blot	ND	37,5%	Cabezón et al. (2010)
Mallorca	2009	Epidemiológica	48	6 d.t.	PCR-Electroforesis	ND	43,8%	Cabezón et al. (2010)
Menorca	1989-1990	Epidemiológica	813	62 d.t.	Dot-ELISA (1/400)	1,4%	0,98%	Seguí-Puntas et al. (1991)
Murcia-	-	Epidemiológica	116	116 d.t.	IFI (1/100)	ND	73,3%	Segovia y Martín-Luengo (1985)
Alicante	-	Epidemiológica	116	116 d.t.	Inmunoelctrofores.	ND	56%	Segovia y Martín-Luengo (1985)
Murcia-	-	Epidemiológica	124	0 d.t.	Ex. parasitológico	ND	2,4%	Segovia y Martín-Luengo (1985)
Alicante	-	Epidemiológica	124	0 d.t.	Ex. parasitológico	ND	2,4%	Segovia y Martín-Luengo (1985)
Navarra	1992	Epidemiológica	653	23 d.t.	IFI (ND)	ND	5,9%	Sesma y Barricarte (1997)
Salamanca	1986	Epidemiológica	433	ND	IFI (1/80)	ND	7,2%	Encinas-Grandes et al. (1988)
Sevilla	-	Epidemiológica	1000	ND	IFI (1/160)	ND	3,1%	Ariza-Astolfi et al. (2007)
Tarragona	1988-1990	Epidemiológica	1169	42 d.p.	Dot-ELISA (1/800)	40%	10,2%	Fisa et al. (1999)
Tarragona	1986-1999	C. Isoenzimas	43	ND	ND	ND	*100%	Gállego et al. (2001)
Tarragona	-	Estud. técnicas	107	ND	Dot-ELISA (1/800)	43,9%	52,3%	Fisa et al. (1997)
Tarragona	-	Estud. técnicas	70	ND	IFI (1/80)	37,1%	45,7%	Fisa et al. (1997)
Tarragona	-	Estud. técnicas	107	ND	Ex. parasitológico	ND	29%	Fisa et al. (1997)
Tarragona- Barcelona ciudad	1984-1986	Epidemiológica	2143	926 d.t.	IFI (1/80)	8%	16%	Portús et al. (1987)
Valencia	-	Epidemiológica	215	ND	ELISA + IFI (ND)	ND	4,7%	Benito-Hernández et al. (2004)
Zaragoza	1979-1983	Epidemiológica	1572	ND	IFI (ND)	ND	8,5%	Castillo-Hernández et al. (1985)

Tabla 5. Distribución y prevalencia de la leishmaniosis canina en España entre los años 1984-2007. C. isoenzimas, caracterización isoenzimática del parásito; C. poblaciones, caracterización de poblaciones caninas; Vacunación m., campañas de vacunación masiva; Seg. temporal, seguimiento de la evolución temporal de uno o varios parámetros clínicos; Estud. técnicas, comparación de varias técnicas para el diagnóstico de la leishmaniosis canina; m.p.d., muestras procedentes de ... perros; d.t., del total de los perros; d.p., de los perros positivos al diagnóstico; H. R. Leishmanina, hipersensibilidad retardada a la Leishmanina (\approx Intradermoreacción de Montenegro); med.neg. + (3XD.E.), media de los controles negativos + 3 veces la desviación estándar; ND, no determinado. *datos de prevalencia (100%) no válidos porque sólo se seleccionaron animales con leishmaniosis canina.

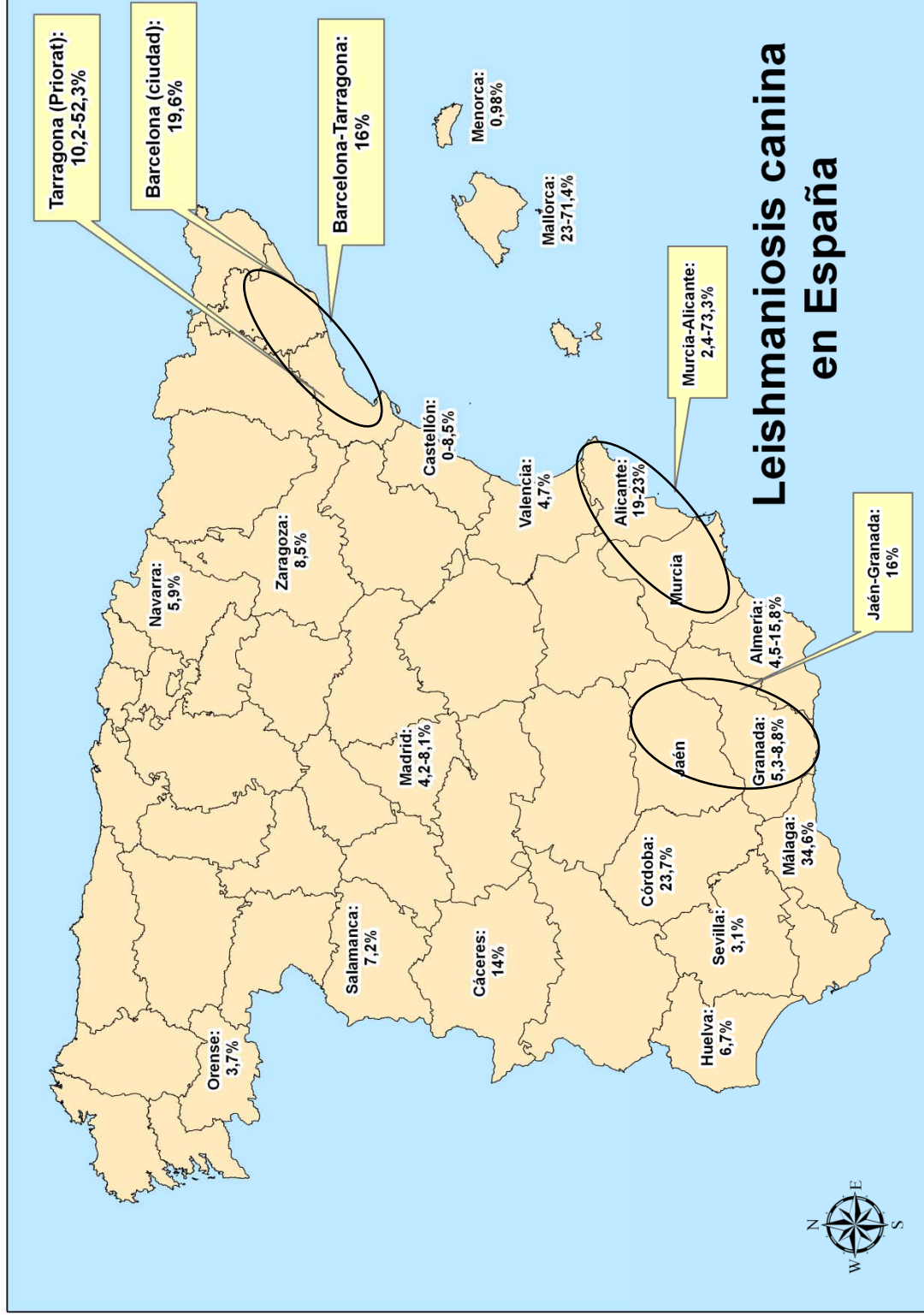


Figura 6. Mapa resumen de la distribución y prevalencia de la leishmaniosis canina en España (datos tomados de la tabla 5).

I.6. Diagnóstico de la leishmaniosis.

I.6.1. Signos clínicos.

Como han indicado Alvar et al. (2004), el diagnóstico de la leishmaniosis humana y canina no presentan grandes diferencias. En ambos casos los signos y síntomas clínicos asociados no son patognomónicos y pueden ser confundidos con los causados por otras patologías (Maia y Campino, 2008). En el caso de la leishmaniosis humana, la malaria, el tifus o la tuberculosis son enfermedades que podrían compartir sintomatología (Sundar y Rai, 2002). Herwaldt (1999) ha realizado una interesante revisión sobre la leishmaniosis donde se detallan con mayor profundidad aquellas patologías que, por sus manifestaciones clínicas, podrían ser confundidas con formas cutáneas o viscerales de la leishmaniosis. En el perro han sido identificadas formas atípicas de la leishmaniosis, donde la sintomatología está atenuada y se asemeja bastante a la provocada por otras enfermedades (Cairó-Vilagran y Font-Grau, 1991). Por tanto, cualquier sospecha clínica debería ser confirmada mediante otros métodos de diagnóstico (Singh y Sivakumar, 2003; Srividya et al., 2011).

I.6.1.a. Leishmaniosis humana.

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 (Fig. 7) y caquexia progresiva. Las linfadenopatías pueden aparecer aunque no de forma constante (Ashford, 2000). Otras alteraciones bien descritas son granulocitopenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia y anemia (W.H.O., 2010). Entre los parámetros serológicos destaca la hipergammaglobulinemia, en especial la activación policlonal de los anticuerpos Ig G por su importante papel en el diagnóstico de la enfermedad (Sanmartín-Durán, 1992).

La leishmaniosis cutánea causada por *L. infantum* suele ser benigna y a menudo autocurativa (Fig. 8 a 12). Al contrario que en la variante visceral, la rápida respuesta inmune de tipo celular que se da en torno al lugar de la picadura

del flebotomo hace que, en caso de proliferar, sólo se origine una lesión cutánea localizada. Los linfocitos, células plasmáticas y macrófagos intervienen para crear una barrera alrededor de las células infectadas. Dada la naturaleza de este tipo de lesiones, no presentan las alteraciones hematológicas y viscerales descritas en la forma visceral, y la detección de la respuesta inmune humoral carece de valor diagnóstico (Iniesta-González, 2007). A veces la barrera celular puede ser superada y el parásito se extiende dando lugar a la leishmaniosis cutáneo-difusa, caracterizada por una débil respuesta inmune celular y humoral (Gállego y Riera, 2000).

En ocasiones, los parásitos pueden diseminarse hasta alcanzar el labio superior, mucosa nasal, faringe o laringe, originando lesiones cutáneo-mucosas cuya respuesta inmunológica es mixta, con un componente celular y otro humoral. En los últimos años se han registrado un creciente número de pacientes co-infectados con VIH que presentan manifestaciones de estas características (Gállego y Riera, 2000; Desjeux P. et al., 2004; Murray et al., 2005).



Figura 7. Caso de leishmaniosis visceral detectado en hospital de Badajoz. Niña con hepato/esplenomegalia. Tomada de Grande-Tejada et al. (2001).



Figura 8.



Figura 9.



Figura 10.



Figura 11.



Figura 12.

Figuras 7 a 12. Lesiones cutáneas características de la leishmaniosis cutánea por *L. infantum*. 8 a 10, nódulos eritematocostrosos; 11, placa eritematocostrosa infiltrada; 12, nódulo eritematoso. Tomada de Urrutia (2001).

I.6.1.b. Leishmaniosis canina.

Los aspectos clínicos de la leishmaniosis canina han sido estudiados en profundidad, aunque el análisis de las poblaciones de perros ha demostrado que los síntomas de la leishmaniosis no obedecen a patrones constantes, y que una parte de los animales que viven en focos endémicos desarrollan la enfermedad con toda su sintomatología, otro grupo presenta infección asintomática persistente y una última fracción resiste a la infección o se recuperan sin desarrollar sintomatología manifiesta (Cabral et al., 1998; Iniesta et al., 2002; Kramer et al., 2006; Baneth y Aroch, 2008; Miró et al., 2008). Cuando los animales desarrollan esta sintomatología patente y no reciben tratamiento, la severidad de las lesiones suele tener consecuencias fatales (Ashford, 1997).

En la leishmaniosis canina no suelen desarrollarse lesiones primarias en el punto de inoculación, y lo habitual es una rápida diseminación del parásito por todo el organismo. Cuando aparecen estas lesiones en el punto de inoculación suelen darse en hocico y orejas (Vidor et al., 1991). De forma similar a lo que ocurre en el hospedador humano las localizaciones más frecuentes son bazo, ganglios, médula ósea, hígado, riñones y piel (Hernández-Rodríguez y Martínez-Moreno, 1992). Por tanto, el cuadro clínico típico de los animales que sufren la enfermedad activa estará relacionado en mayor medida con estos órganos (Solano-Gallego et al., 2001; Alvar et al., 2004; Pinna-Parpaglia et al., 2007; Baneth et al., 2008; Maia y Campino, 2008):

- Daños estructurales (Fig. 13 a 17).
 - Atrofia muscular.
 - Linfadenomegalia.
 - Descamación cutánea.
 - Dermatitis pustular, nodular, ulcerativa o exfoliativa.
 - Alopecia.
 - Esplenomegalia.
 - Insuficiencia renal.
 - Lesiones en huesos y articulaciones.

- Epistaxis o hemorragias nasales derivadas de la trombocitopenia.
 - Onicogrifosis.
 - Lesiones nodulares en la lengua.
 - Manifestaciones oculares.
- Alteraciones analíticas.
- Anemia progresiva cuya intensidad ha sido relacionada con el avance de la enfermedad.
 - Leucopenia.
 - Hipergammaglobulinemia.
 - Hipoalbuminemia.
 - Alteración de los indicadores de la función hepática (GOT, GTP) y renal (urea, creatinina).

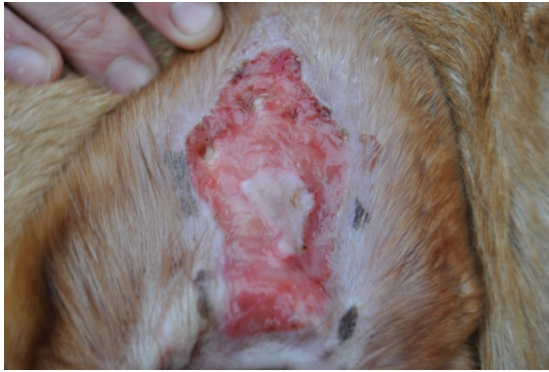


Figura 13.



Figura 14.



Figura 15.



Figura 16.



Figura 17.

Figuras 13 a 17. Lesiones más comunes en la leishmaniosis canina. 15, lesión cutánea en oreja con infiltración; 16, lesión mucosa en nariz con pérdida de tejido; 17, lesión cutánea; 18, onicogriposis; 19, lesiones nodulares en lengua. Imágenes cedidas por Corpas-López V.

I.6.2. Identificación mediante microscopía y aislamiento.

Los tejidos más empleados para tal finalidad han sido hígado, bazo, médula ósea y nódulos linfáticos. La principal limitación de estos métodos es su baja sensibilidad, ya que el número de amastigotes suele ser bajo/moderado, especialmente en animales asintomáticos (Solano-Gallego y Baneth, 2008). Además, existe riesgo de hemorragias y posterior infección por tratarse de órganos hematopoyéticos y de difícil acceso (Hernández-Rodríguez y Martínez-Moreno, 1992; Sundar y Rai, 2002). Otros tejidos que comportan menos peligro son la sangre completa (leucoconcentrado) o muestras cutáneas (Reale et al., 1999; Alvar et al., 2004; Manna et al., 2004). Los factores limitantes asociados al aislamiento en cultivo son el tiempo necesario (de 1 a 6 semanas) o el elevado riesgo de contaminación. Los medios de cultivo más utilizados son Novy, Nicolle, MacNeal's (NNN), medio Schneider para *Drosophila*, Evans Modified Tobie's Medium (EMTM), etc. (Evans et al., 1989). La observación microscópica se suele realizar mediante improntas teñidas con Giemsa. Según Miró et al. (2008) el aislamiento y/o observación microscópica del parásito, aunque concluyentes, no son métodos aconsejables para el diagnóstico rápido de la enfermedad.

I.6.3. Inoculación en animales de laboratorio y xenodiagnóstico.

Entre los animales de experimentación más utilizados se encuentran los cricetos o hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) y los ratones balb/c. No son métodos habituales de diagnóstico porque se requieren varios meses de incubación para obtener resultados positivos, aunque son recomendables en aquellos casos en los que el riesgo de contaminación de las muestras es elevado, o cuando las cepas son de difícil crecimiento. 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 comprendido entre 1-3 meses pueden observarse los parásitos o ser aislados a partir del bazo, hígado, médula ósea, o ganglios linfáticos (Hernández-Rodríguez y Martínez-Moreno, 1992).

También se ha usado la técnica basada en la detección y aislamiento de *Leishmania* mediante la infección y posterior disección del vector natural del

parásito (Maia y Campino, 2008), lo que se conoce como xenodiagnóstico. Salvo en raras ocasiones, no es un método muy empleado en la leishmaniosis canina por requerir laboratorios especializados y por las dificultades para crear una colonia de flebotomos estable (Alvar et al., 2004). No obstante, Molina et al. (1994) han conseguido aislar el parásito a partir de *Phlebotomus perniciosus* alimentados con perros de sintomatología variable, incluyendo animales asintomáticos.

I.6.4. Detección de antígenos circulantes.

Los niveles de antígenos se encuentran directamente relacionados con la carga parasitaria, y su especificidad es superior a la de las pruebas basadas en la detección de anticuerpos. Resulta una alternativa factible en pacientes con baja respuesta de anticuerpos. Las limitaciones de estos métodos se encuentran relacionadas con la presencia de componentes en el suero que podrían enmascarar a los determinantes antigénicos, o inhibir competitivamente la unión con los antígenos.

En la búsqueda de procedimientos menos invasivos han sido desarrolladas técnicas que permiten detectar antígenos de *Leishmania* en orina mediante partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos específicos (KAtex, Kalon Biological L.t.d., Aldershot, Reino Unido). Los resultados obtenidos los sitúan como buenos candidatos para el diagnóstico y monitorización de pacientes sometidos a tratamiento antileishmánico, incluyendo infecciones sub-clínicas en individuos VIH co-infectados (Attar et al., 2001; Riera et al., 2004). La dificultad para obtener orina a partir de los perros hace que estos métodos sean poco adecuados para el diagnóstico de la leishmaniosis canina.

I.6.5. Métodos inmunológicos.

El diagnóstico inmunológico se basa en la detección de una respuesta inmune humoral (Th2) o celular (Th1) específica desarrollada por el hospedador frente a la infección por *Leishmania* (Singh y Sivakumar, 2003; Rodríguez-Cortés et al., 2007). Hace años que es conocida la dicotomía de la respuesta inmune en

la infección por *Leishmania*. Como hemos avanzado en el sub-apartado I.6.1.a., en el hombre esta dualidad va a favorecer que el parásito se disemine por el organismo visceralizándose en ciertos órganos diana, o que quede confinado en la región de la picadura. En los perros, la protección que confiere la inmunidad celular mediada por los linfocitos Th1 parece ser la causa de las formas asintomáticas o crípticas de la leishmaniosis canina, mientras que la respuesta mediada por células Th2 ha sido relacionada con la progresión o agravamiento de la enfermedad a su forma sintomática (Cabral et al., 1992; Pinelli et al., 1994; Cabral et al., 1998; Barbieri, 2006).

En términos generales los métodos de diagnóstico serológico basados en la detección de anticuerpos no pueden diferenciar entre infecciones activas o pasadas, y sólo informan del historial de exposición al parásito (Baneth y Aroch, 2008; Quinnell y Courtenay, 2009). Otra limitación sería la ya comentada disparidad de criterios en la selección de los títulos umbrales de anticuerpos (en los métodos cuantitativos), lo que llevaría a que una misma técnica pudiese aportar distintas seroprevalencias. Dicha falta de consenso afecta directamente a los porcentajes de animales con títulos dudosos o perros que, sin ser seronegativos, no alcanzan el umbral de positividad establecido (Martín-Sánchez et al., 2001). El elevado número de estos animales descritos en zonas de alta endemidad (Fisa et al., 1992; Morillas-Márquez et al., 1992; Morillas et al., 1996; Sanchís-Marín et al., 1997; Acedo-Sánchez et al., 1998; Fisa et al., 1999; Lepe et al., 2000) debería ser motivo suficiente para profundizar en su significado. Fisa et al. (1997) han sugerido que los títulos cercanos al umbral deben ser interpretados con cautela, y otros autores han avanzado que podrían deberse a un déficit en la respuesta inmune humoral, a periodos prepatentes de la enfermedad, situaciones de resistencia, reacciones cruzadas con otras infecciones, o indicativos de una posible recaída (Singh y Sivakumar, 2003; Alvar et al., 2004; Gomes et al., 2008).

La necesidad de incrementar la especificidad de estas técnicas para evitar reacciones cruzadas, y los trabajos dirigidos al diseño de vacunas humanas o caninas eficaces frente al parásito han llevado a la obtención de numerosos polipéptidos o antígenos recombinantes –KMP-11, LI gp63, Hsp90, Hsp70, A2, K9, K26, K39, K40, H2A, proteína Q– que han sido ensayados con finalidad

diagnóstica (Soto et al., 1998; Nieto et al., 1999; Otranto et al., 2004; Barbieri, 2006; Miró et al., 2008; Carcelén et al., 2009).

Breve valoración de los métodos de diagnóstico más comunes basados en la detección de la respuesta inmune (Hernández-Rodríguez y Martínez-Moreno, 1992; Sundar y Rai, 2002; Singh y Sivakumar, 2003; Alvar et al., 2004; Iniesta-González, 2007; Romero-Peñuela y Sánchez-Valencia, 2007; Maia y Campino, 2008):

❖ **Detección de la inmunidad humoral:**

- ✓ ***Inmunofluorescencia indirecta:*** Técnica muy sensible que es considerada referencia del diagnóstico serológico por la W.H.O. Su empleo está extendido en los ámbitos epidemiológico y veterinario. Entre sus principales limitaciones se han descrito la necesidad de personal especializado, materiales costosos (microscopio de fluorescencia), y el tiempo empleado en la lectura.
- ✓ ***Agglutinación directa:*** Presenta buena especificidad, sensibilidad, bajo coste y no requiere equipamiento especializado. Por todo ello podría considerarse una técnica apropiada para los estudios de campo, aunque la duración de las incubaciones (18 horas) puede resultar limitante. Este método emplea suspensiones o liofilizados de promastigotes. Para reducir los tiempos de incubación y preparación del antígeno de captura se han diseñado variantes de este método como es el “Fast Agglutination Screening Test”, que permite obtener los resultados en 3 horas y emplea sangre sin diluir.
- ✓ ***ELISA (Inmunoensayo ligado a enzimas):*** Método muy útil en el serodiagnóstico de la leishmaniosis. El antígeno seleccionado va a condicionar notablemente su especificidad, y en general es considerada una técnica muy sensible. Su gran versatilidad para adaptarse a diferentes antígenos ha permitido que en los últimos años se hayan ensayado con esta técnica toda una serie de polipéptidos recombinantes.

- ✓ **Kits inmunocromatográficos:** Los antígenos recombinantes fijados a una tira de nitrocelulosa permiten capturar los anticuerpos del suero problema. Formato sencillo, fácil uso y rápida respuesta son las características principales de estos dispositivos, que los hacen idóneos para el diagnóstico de campo. Algunos autores han manifestado que las temperaturas necesarias para la conservación del tampón y del propio dispositivo (en frío) podrían resultar limitantes. Otra restricción sería su elevado coste.
- ✓ **Western blot:** Método restringido al ámbito de la investigación por exigir demasiado tiempo, personal especializado y por su elevado coste. Tampoco existe pleno acuerdo sobre cuáles son los patrones de bandas que diferencian la infección de la enfermedad. La ventaja es que permite documentar simultáneamente la respuesta de anticuerpos expresados por el hospedador frente a los distintos componentes antigénicos del parásito.

❖ **Detección de la inmunidad celular:**

- ✓ **Reacción de Montenegro:** Revela la respuesta de hipersensibilidad retardada del hospedador frente al antígeno de *Leishmania* (leishmanina). La leishmanina es una suspensión estéril de promastigotes de *Leishmania* (completos o lisados) tratados con fenol, que son inoculados vía intradérmica. La respuesta inmune celular detectada es positiva en animales con capacidad de autocuración o al término de un tratamiento eficaz. Esta respuesta también es positiva en humanos con leishmaniosis cutánea y tras la curación de una leishmaniosis visceral, mientras que los individuos en fases activas e iniciales de la misma no reaccionan frente a la leishmanina. Es un método simple y barato, aunque entre sus desventajas destacan el tiempo de espera para la interpretación de los resultados (72 horas), y la posibilidad de que individuos sanos sometidos a la prueba queden sensibilizados y resulten positivos en posteriores ensayos (falsos positivos).
- ✓ **Estimulación linfocitaria:** Técnica que mide la proliferación de los linfocitos cuando son estimulados con antígenos solubles de *Leishmania* y

mitógenos. Esta proliferación se expresa mediante el índice de estimulación (células estimuladas/ células no estimuladas). Al igual que ocurre con el test de Montenegro, la respuesta es positiva en perros asintomáticos y resistentes, o cuando los animales responden bien a los tratamientos. En cuanto a las limitaciones es destacable la falta de un criterio consensuado para establecer el índice de estimulación umbral, y la posibilidad de que los resultados puedan verse alterados por la genética o inmunología propia del hospedador.

I.6.6. Métodos moleculares.

Procedimientos basados en la detección de secuencias de ADN específicas de género (*Leishmania*), o de especie (*L. infantum*). Estos métodos han sido utilizados en estudios de prevalencia de la infección, determinación de la estructura y distribución de las poblaciones, diagnóstico clínico, seguimiento de casos, y análisis de fenómenos de resistencia a los tratamientos. Por todo ello han contribuido en gran medida al conocimiento de la enfermedad (Schönian et al., 2008).

La incorporación de los métodos moleculares 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-Bellon 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).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es el método molecular que ha aportado mayor sensibilidad al diagnóstico de la leishmaniosis (Solano-Gallego y Baneth, 2008). A esta mejora ha contribuido la selección de cebadores que amplifican dianas moleculares muy repetidas en el genoma del parásito. Las PCR basadas en la amplificación de secuencias de la región del minicírculo del ADN del Kinetoplasto (kADN) parecen aportar mayor sensibilidad que las basadas en otras secuencias menos repetidas en el genoma del parásito, como son genes

ribosomales o regiones del espaciador interno transcrito o ITS (Lachaud et al., 2002; Miró et al., 2008). Además, la hibridación de los productos amplificados con sondas específicas ha contribuido a incrementar la eficiencia de la técnica (Ashford et al., 1995; Martín-Sánchez et al., 2001; Alvar et al., 2004; Oliveira et al., 2005).

Por su mayor sensibilidad, esta prueba permite analizar un amplio abanico de tejidos, entre los que se encuentran nódulos linfáticos, aspirados de médula ósea, sangre completa, leucoconcentrado, muestras cutáneas, hígado, bazo, piel, orina, o incluso frotis o improntas (Strauss-Ayali et al., 2004; Solano-Gallego y Baneth, 2008). Algunos autores han indicado que la médula ósea o los tejidos linfáticos aportan mayor sensibilidad a la técnica (Manna et al., 2004), aunque los resultados obtenidos en otros estudios han sido variables y discordantes (Solano-Gallego et al., 2001; Manna et al., 2004; Gomes et al., 2008; Chitimia et al., 2011).

Estos y otros datos indican que la eficacia de la PCR dependerá de factores como son los primers seleccionados, número de copias de la secuencia diana, método de extracción del ADN, tipo de tejido o material biológico, y protocolo seguido (Maia y Campino, 2008).

Como venimos diciendo, los métodos moleculares han supuesto un importante avance en el diagnóstico de la leishmaniosis, pero al igual que ocurre con las serologías no están exentos de limitaciones. En el caso de la PCR han sido referidas incompatibilidades de resultados con otras pruebas, y animales que han resultado negativos con estas técnicas podrían ser serológicamente positivos o viceversa (Berrahal et al., 1996; Reale et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2001; Oliva et al., 2006). Según Baneth y Aroch (2008) estos resultados suelen obtenerse con perros asintomáticos que han sido expuestos al parásito, sin que se sepa con certeza cómo evolucionará la enfermedad *a posteriori*. Otros autores han manifestado que podrían deberse a errores de procedimiento relacionados con una extracción deficiente del ADN de la muestra (Mathis y Deplazes, 1995).

Sin embargo, la principal restricción de la PCR ha sido la aparición de falsos positivos por contaminación de las muestras con ADN externo, debida en muchos casos a la excesiva manipulación de las muestras -extracción del ADN,

amplificación y detección del amplificado-. Para solventar este problema se ha diseñado una nueva PCR en la que se han reducido los tiempos y el manejo de las muestras en exceso. Esto es debido a que el nuevo dispositivo de PCR incorpora todos los componentes necesarios para la amplificación y detección de los productos de amplificación, y a su vez permite analizar los datos obtenidos *in situ*. Esta PCR, conocida como PCR a tiempo real, se basa en el empleo de marcadores fluorescentes que permiten la monitorización de los productos de amplificación. Además, mediante la construcción de curvas de estándares, esta técnica ofrece la posibilidad de cuantificar la carga parasitaria presente en la muestra de partida, por lo que sería aplicable al seguimiento y monitorización de pacientes sometidos a tratamiento antileishmánico (Bell y Ranford-Cartwright, 2002; Monis et al., 2005; Gomes et al., 2008). Su principal limitación está relacionada con su elevado coste, de forma que su utilización permanece restringida a aquellos laboratorios que cuentan con los reactivos y el equipamiento necesarios (Srividya et al., 2011).

I.6.7. Comparación de métodos en el diagnóstico de la leishmaniosis canina.

Durante años se ha comparado la capacidad de diversas técnicas serológicas y/o moleculares en el diagnóstico de la leishmaniosis. En conjunto, la interpretación de los resultados derivados de estos trabajos podría ser una herramienta fundamental para avanzar en el conocimiento de las propiedades de los métodos empleados y de la propia enfermedad. Sin embargo, realizar un metaanálisis comparativo de estas publicaciones es a menudo una labor difícil. Los principales obstáculos se encuentran relacionados con la falta de consenso en la metodología, marcadores serológicos (clases o isotipos de anticuerpos detectados), antígenos empleados, umbrales de positividad o dianas moleculares entre otros.

Por otro lado existen toda una serie de factores vinculados en mayor o menor medida con el reservorio canino que podrían afectar a los resultados obtenidos con los procedimientos serológicos, aportando mayor complejidad. Numerosos estudios han arrojado un poco de luz, si bien no han aclarado en su totalidad, sobre cuáles son estos elementos innatos al animal, a la propia

infección o incluso relativos a la actividad vectorial que podrían modificar la respuesta humoral desarrollada. Entre estos factores podemos destacar las características de los perros referidas en el apartado 1.5.2. –edad, sexo, pelo, lugar donde viven/pernoctan, etc.–, sintomatología del animal (Pinelli et al., 1994; Cabral et al., 1998; Nieto et al., 1999), tiempo transcurrido desde la infección inicial (Oliva et al., 2006; Rodríguez-Cortés et al., 2007), o estacionalidad del vector en relación a los periodos de exposición/re-exposición con el patógeno (Acedo-Sánchez et al., 1998; Fernández-Bellón et al., 2008). Todo ello ha llevado a que los datos derivados de estos estudios resulten, con frecuencia, contradictorios y por tanto inconcluyentes.

Dada la abundancia de estudios realizados, y que algunos de ellos se han incluido y discutido en las publicaciones derivadas del presente trabajo, no hemos creído conveniente volver a citarlos y comentarlos en este apartado.

I.7. Los flebotomos en España.

I.7.1. Distribución.

La primera referencia escrita sobre los flebotomos en España data de 1909 (Czerny y Strobl, 1909), donde se informaba de la identificación por parte de Lauffer de *Phlebotomus (P.) papatasi* (hoy *P. papatasi*) en El Escorial (Madrid). León-Sanz et al. (1998) tuvieron la oportunidad de volver a analizar estos especímenes en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, y pudieron constatar que la especie identificada como *P. papatasi* era en realidad *P. ariasi*, y que en este mismo grupo de especímenes había también dos hembras de *P. perniciosus*. Pittaluga y de-Buen (1918) describieron la morfología y presencia de *P. papatasi*, *P. legeri* (hoy *P. perniciosus*), *P. minutus* (hoy *Sergentomyia minuta*) y *P. sergenti* en Málaga, Granada, Cáceres o Palma de Mallorca. Desde entonces y hasta mediados de los años 60 numerosos autores –Gil-Collado; Torres-Cañamares; Elvira; Zariquiey-Álvarez; Nájera-Angulo; Vives-Sabater y Houin- han aportado información sobre la morfología y distribución de las distintas especies de flebotomos presentes de España (Gil-Collado et al., 1989).

Dada la similitud morfológica y biométrica descrita entre ambas especies (Morillas-Márquez et al., 1991; Collantes y Martínez-Ortega, 1997), los *P. longicuspis* referidos en España han sido considerados como *P. perniciosus* en la presente revisión y en las clasificaciones incluidas en esta memoria. Estudios basados en la técnica de RAPD, el análisis comparativo de secuencias de ADN de un fragmento del *Citocromo b* mitocondrial (mtDNA) y las isoenzimas avalan esta consideración (Martín-Sánchez et al., 2000; Pesson et al., 2004).

Los trabajos realizados por Gil-Collado et al. (1989) y Gállego-Berenguer (1992) han ofrecido una visión de conjunto de la distribución, morfología y biología de estos dípteros en el territorio nacional. Los primeros autores indicaron que las especies citadas desde principios de siglo (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *Sergentomyia* (*S.*) *minuta*) se encontraban distribuidas en la mayor parte de España, siendo su presencia inferior en la zona cantábrica. En el sudeste peninsular aparecerían tres nuevas especies sólo descritas en África con anterioridad (*P. alexandri*, *P. chabaudi* y *P. longicuspis* = *P. perniciosus*), y en las Islas Canarias *P. fortunatarum* como especie exclusiva del archipiélago, y *S. fallax*. Este mapa quedaría completo con la presencia de *P. mascittii* en Cataluña. Por tanto, las 10 especies referidas hasta la época pertenecerían a los géneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia*.

Gállego-Berenguer et al. (1992), por su parte, actualizaron los datos de distribución de los flebotomos en el noreste peninsular, Avila y Baleares. Además, abordaron la importancia de seleccionar un método de captura apropiado, aspecto que resultaría determinante para evitar sesgos en los muestreos. Según estos autores, las trampas adhesivas no ejercen ningún tipo de atracción sobre los flebotomos, y estos son capturados cuando se dirigen a sus lugares de reposo, alimentación y cría. Las especies pertenecientes al sub-género *Larrousius* (*P. perniciosus* y *P. ariasi*), dado su mayor fototropismo, verían incrementada su proporción cuando se utilizan trampas luminosas, mientras que con las trampas adhesivas *S. minuta* sería la especie más ubicua y abundante (véase tabla 6). A su vez, elaboraron una clave de clasificación basada en la morfología de las estructuras genitales de machos y hembras, aunque no se incluyeron las especies halladas por Úbeda-Ontiveros (1982) y Morillas-Márquez

et al. (1984) en el archipiélago canario (*P. fortunatarum* y *P. fallax* respectivamente), como sí lo hicieron Gil-Collado et al. (1989).

En la actualidad no se han referido nuevas especies de flebotomos, con la salvedad de *P. langeroni*, descrita por diversos autores en Madrid (Martínez-Ortega et al., 1996; Conesa-Gallego et al., 1997) y Zaragoza (Lucientes et al., 1994; Lucientes et al., 2001). En lo referente a la distribución, Aransay et al. (2004) han incorporado *P. papatasi* y *P. sergenti* a las especies descritas en La Rioja, y a *P. ariasi* como única especie identificada en Álava. León-Sanz et al. (1999) han revisado la colección de especímenes de Nájera, notificando la presencia de *P. papatasi* en Valencia y Guadalajara. Con estos datos quedaría completo el mapa de distribución de los flebotomos en España (fig. 18).

Introducción

Género *Phlebotomus* Rondani, 1843

- Sub-género *Phlebotomus* Rondani, 1843
- *P. papatasi* Scopoli, 1786
- Sub-género *Paraphlebotomus* Theodor, 1948
- ★ *P. alexandri* Sinton, 1928
- ☆ *P. chabaudi* Croset, Abonnenc et Rioux, 1970
- ◻ *P. sergenti* Parrot, 1917
- Sub-género *Adlerius* Nitzulescu, 1931
- ✎ *P. mascittii* Grassi, 1908
- Sub-género *Abonnencius* Nitzulescu, 1931
- ✎ *P. fortunatarum* Úbeda-Ontiveros et al., 1982
- Sub-género *Larrousius* Nitzulescu, 1931
- *P. ariasi* Tonnoir, 1921
- *P. perniciosus* Newstead, 1911
- ▣ *P. langeroni* Nitzulescu, 1930

Género *Sergentomyia* Franca et Parrot, 1921

- Sub-género *Sergentomyia* Franca et Parrot, 1921
- *S. minuta* (Rondani, 1843)
- ⊗ *S. fallax* (Parrot, 1921)

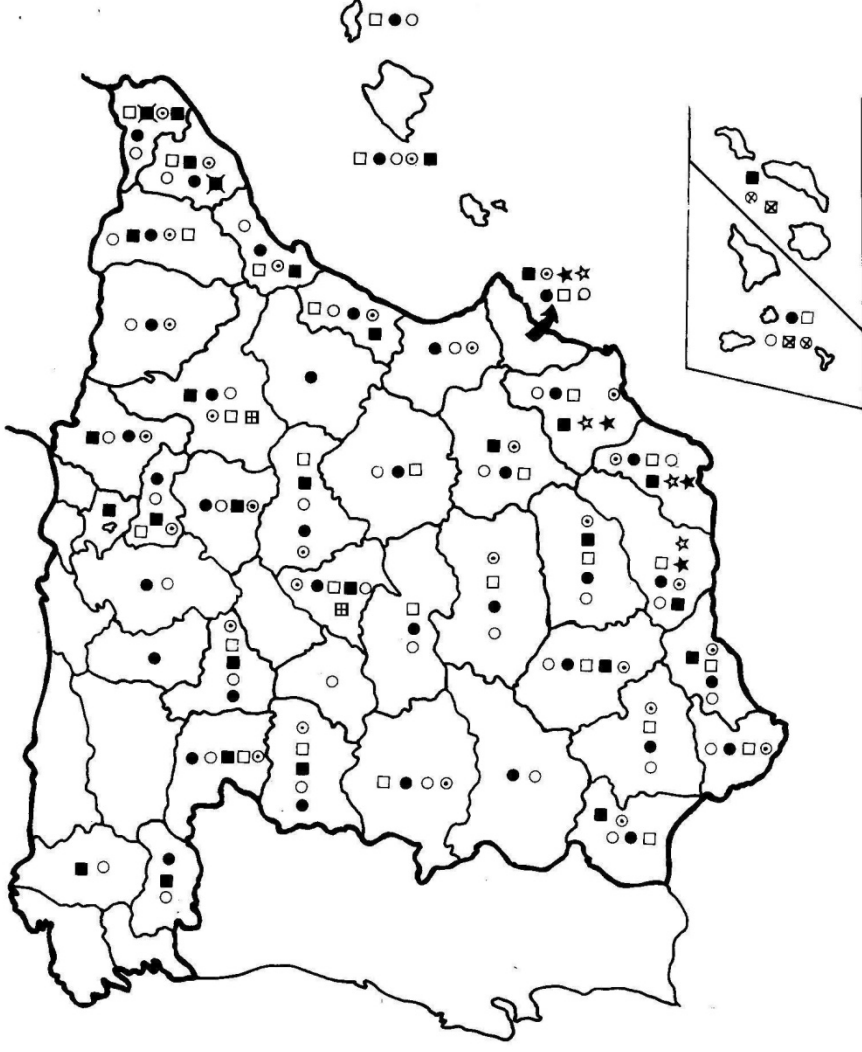


Figura 18. Especies de flebotomos descritas en España y mapa de distribución. Información tomada de Gil-Collado et al. (1989) y actualizada por Gállego-Berenguer et al. (1992). Aportaciones posteriores de Lucientes et al. (1994); Martínez-Ortega et al. (1996); Conesa-Gallego et al. (1997); León-Sanz et al. (1999); Lucientes et al. (2001); Aransay et al. (2004).

Introducción

Provincia	Año	Método de captura	S. m.	*P. p.	P. a.	P. s.	P. pa.	P. al.	P. ch.	Referencia
Almería	1972	Trampa aspiración	168	155	12	4	12	2	-	Rioux et al. (1974a).
Almería	1973	Trampa aspiración	11	253	31	4	2	-	5	Rioux et al. (1974b).
Granada	-	Papel adhesivo	1510	417	245	16	1	-	-	Guevara-Benítez et al. (1978)
Granada	-	Papel adhesivo	9197	3620+15	1187	137	31	-	4	Morillas-Márquez et al. (1983)
Almería	1983	Papel adhesivo	85	524+5	32	53	36	5	-	Martínez-Ortega (1985a)
Murcia-Alicante	1982	Trampa luminosa	85	390+8	42	64	63	-	11	Martínez-Ortega (1985b)
		Papel adhesivo	1269	927+50	64	274	101	-	2	
		Cebo humano	-	71	-	1	51	-	-	
Almería	-	Papel adhesivo	11409	6073	-	656	1241	-	-	Sanchis-Marín et al. (1986)
Almería-Murcia-Alicante	1983-1985	Trampa luminosa	4042	6124+101	898	2047	1882	583	24	Martínez-Ortega y Conesa-Gallego (1987a)
		Papel adhesivo								
		Cebo humano								
Almería	1990	Papel adhesivo	11731	7455+98	461	686	1637	95	3	Morillas-Márquez et al. (1991)
		P. adh. iluminado								
		Trampa luminosa								
Número de ejemplares totales			39507	26286	2972	3942	5057	685	49	78498
Porcentaje de ejemplares totales			50,3%	33,5%	3,8%	5,0%	6,4%	0,9%	0,1%	100%

Tabla 6. Especies de flebotomos descritas en el sudeste de la Península Ibérica. *S. m.*, *Sergentomyia minuta*; *P. p.*, *P. perniciosus*; *P. a.*, *P. ariasi*; *P. s.*, *P. sergenti*; *P. pa.*, *P. papatasi*; *P. al.*, *P. alexandri*; *P. ch.*, *P. chabaudi*. * Los ejemplares de *P. perniciosus* han sido sumados con los de *P. longicuspis*.

I.7.2. Caracteres morfológicos generales de la Familia *Phlebotomidae*.

Son dípteros de pequeño tamaño (1,5 a 3,5 mm), color amarillento, y cuerpo y alas densamente peludos. Presentan cuerpo giboso y dos alas muy nerviadas que en posición de reposo se disponen formando un ángulo de 45 grados entre sí. Las patas son alargadas y esbeltas. Su estructura general, como todos los insectos hexápodos está constituida por tres unidades funcionales: cabeza, tórax y abdomen (Gállego-Berenguer, 2006).



Figura 19. Hembra de flebotomo. Tomada de Shabaan-El-Hossary, (2006).

LA CABEZA

La cabeza (Fig. 20) se encuentra constituida en su mayor parte por una estructura quitinosa capsular o **epicráneo** y dos grandes **ojos multifacetados**. El epicráneo se halla dividido en tres partes: **occipucio**, **vértice** y **frente**. Esta última se prolonga hasta el **clípeo**, donde va insertado el aparato picador-chupador del flebotomo o **probóscide** (hembras). Entre los ojos se localiza la **sutura interocular**, y a su altura unas piezas muy irregulares conocidas como **escape** o primera pieza de la antena. De los 16 fragmentos que constituyen cada antena el segundo es el **pedicelo** o **torus**, en el que se fijan los 14 **artejos** restantes. Desde el primer artejo del flagellum o tercera pieza de la antena hasta el final de ésta se pueden ver una serie de finas **sedas** y otros elementos más gruesos, refringentes y acodados en su base, que Newstead denominó **espinas geniculadas** o **ascoides** con función sensorial. Estos ascoides pueden ser empleados con finalidad taxonómica mediante el cálculo de la “fórmula antenal”, que resulta del cociente entre el número de ascoides y los segmentos con dicho número de ascoides.

En la hembra la probóscide está constituida por seis piezas que se hayan protegidas ventralmente por el **labium**, y cuyo conjunto se denomina fascículo (Fig. 21):

1. **Labro-epifaringe**. Estructura muy quitinizada con forma de hoja de espada y cruzada ventralmente por un canal punteado de **papilas sensoriales** o **hirsut glands**, hasta terminar en la cavidad bucal.
2. **Dos mandíbulas**. Son largas palas afiladas que se disponen una sobre la otra. En el extremo terminal presentan pequeñas denticulaciones en el borde interno.
3. **Dos maxilas**. Más gruesas que las mandíbulas, 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**,

constituidos por cinco segmentos, de los cuales el quinto es más largo, aunque a veces se encuentra muy reducido en algunas especies neotropicales.

4. **Hipofaringe.** Pieza simétrica terminada en dientes de sierra (delgados y flexibles) que está cruzada por el **canal salival**. En su porción anterior, a la altura del clípeo, se une al labro-epifaringe prolongándose al interior de la cavidad cefálica.

El labium constituye la pieza más voluminosa de la probóscide. La parte basal está constituida por una placa pseudotriangular (**mentum**) en cuyo extremo descansan las **labelas**, que son apéndices móviles bisegmentados. Estos segmentos, que se encuentran separados por una fisura interna membranosa, sobresalen por la región dorsal.

El **cibarium** es una estructura con gran capacidad suctoria 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**. 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, la **armadura faríngea**. Tanto el cibarium como la faringe y su armadura faríngea son elementos que, dada su variabilidad morfológica, ostentan gran importancia taxonómica (Abonnenc, 1972; Morillas Márquez, 1981; Léger y Depaquit, 1999).

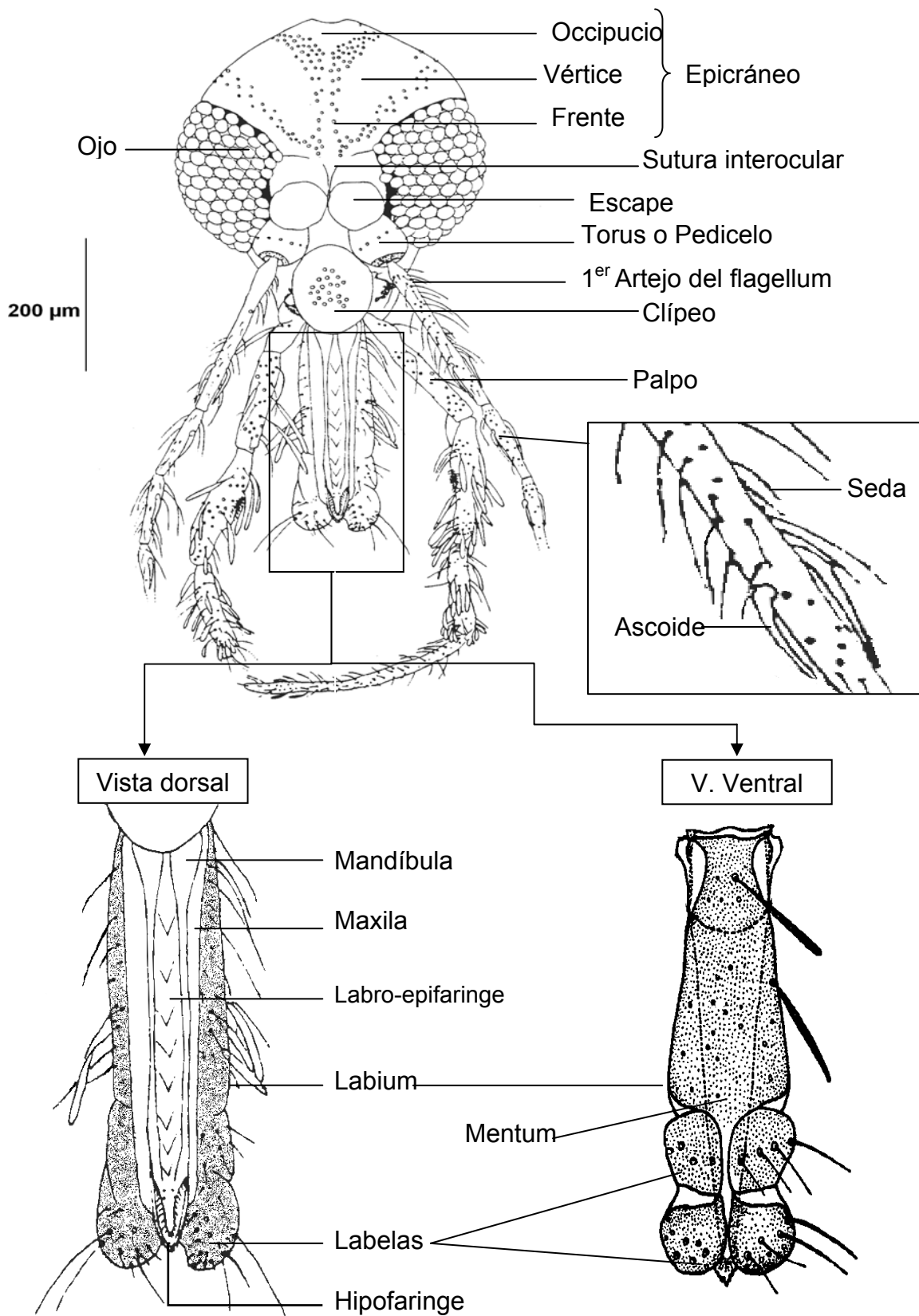


Figura 20. Tomadas de Abonnenc (1972); Léger y Depaquit (1999). Modificadas por el autor.

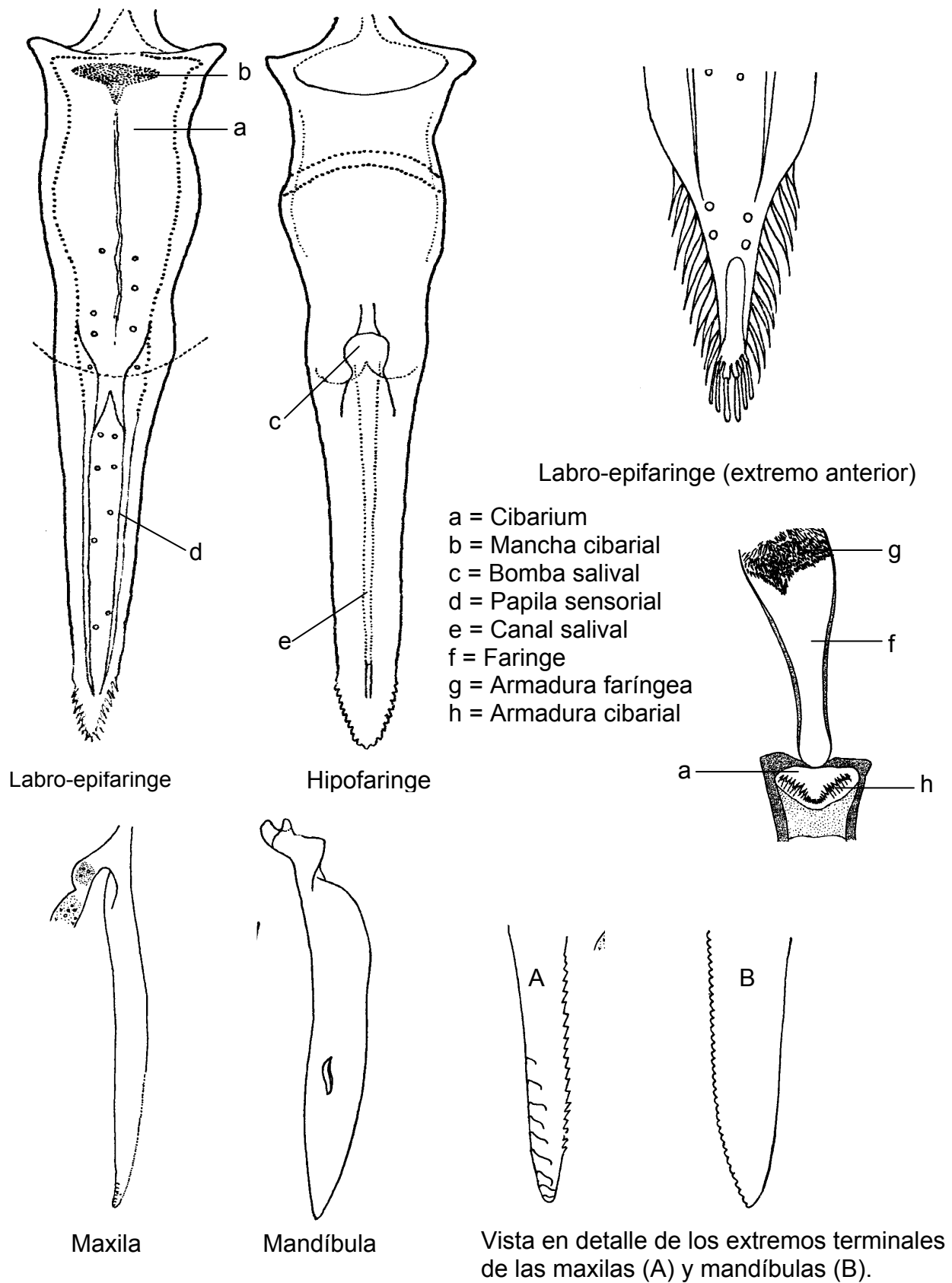


Figura 21. Tomadas de Abonnenc (1972); Léger y Depaquit (1999). Modificadas por el autor.

EL TÓRAX

El tórax (Fig. 23), cubierto de pelos y giboso se levanta por encima de la cabeza. Está compuesto por tres segmentos: **protórax**, **mesotórax** y **metatórax**. A cada uno de estos metámeros se fijan un par de patas de gran longitud (hasta tres veces la corporal). El protórax es muy pequeño y parcialmente cubierto por el mesotórax, el cual se encuentra más desarrollado y presenta dos **alas** cuyas nerviaciones son de gran interés taxonómico genérico. En el metatórax se distinguen dos pequeños apéndices o estigmas de un segundo par de alas denominados **halterios** o balancines cuya función es estabilizar el vuelo del flebotomo (Davis, 1967; Morillas Márquez, 1981).

Como se ha mencionado, desde un punto de vista sistemático las estructuras más destacables de esta unidad funcional son las alas (Fig. 22). Estas son lanceoladas y muy pilosas. Presentan abundantes nerviaciones longitudinales y algunas transversas. Los parámetros taxonómicos empleados en su caso son las posiciones relativas de diversos puntos de confluencia de dichas nerviaciones (Roiux y Golvan, 1969). De este modo, en las especies del género *Phlebotomus* $\alpha > \beta$, mientras que en las pertenecientes al género *Sergentomyia* $\alpha < \beta$.

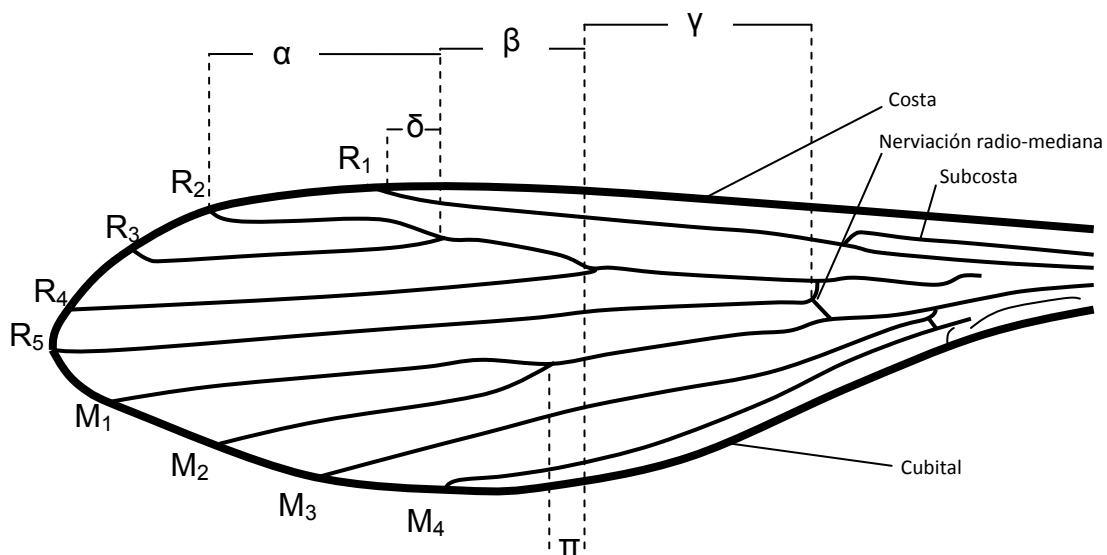


Figura 22. Morfología del ala.

Introducción

Estas nerviaciones reciben la siguiente nomenclatura:

1ª Longitudinal simple: R₁.

2ª Longitudinal o sector radial: Se divide en R₂, R₃ y R₄.

3ª Longitudinal simple: R₅.

4ª Longitudinal: M₁ y M₂.

5ª Longitudinal simple: M₃.

6ª Longitudinal simple: M₄.

7ª Longitudinal simple o cubital.

EL ABDOMEN

El abdomen (Fig. 23) está formado por diez segmentos, de los cuales el primero se fija al tórax y los dos últimos segmentos, muy modificados, conforman el **aparato genital externo**. De aspecto cilíndrico, cada segmento presenta una placa quitinosa dorsal o **tergito** y otra ventral o **esternito** unidas por una membrana elástica o **pleura** (Dolmatova y Demina, 1971).

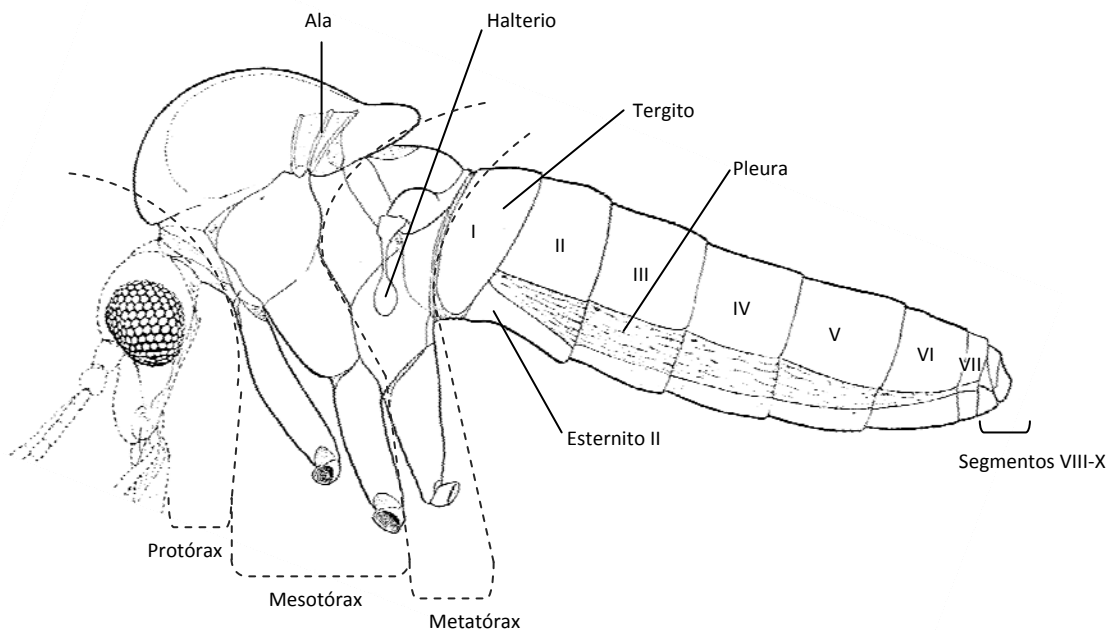


Figura 23. Abdomen y tórax de hembra de flebotomo. Tomada de Davis (1967). Modificada por el autor.

Abdomen terminal y estructuras genitales de la hembra de flebotomo:

En estado de reposo los segmentos del 8 al 10 se encuentran involucionados dentro del séptimo tergito y esternito. Estas piezas sólo se encuentran extendidas durante la ovoposición, apareamiento y defecación (Davis, 1967). El octavo tergito, más desarrollado que los precedentes continúa en la región ventral con un esternito lobulado denominado **gonapófisis ventral**. A continuación se dispone el noveno 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** (Abonnenc, 1972). En la práctica, uno de los elementos más utilizados para la clasificación de especies es la espermateca con su **cabeza (a)**, **cuello (b)**, **cuerpo o reservorio (c)** y **conductos espermáticos (d)** (Fig. 24).

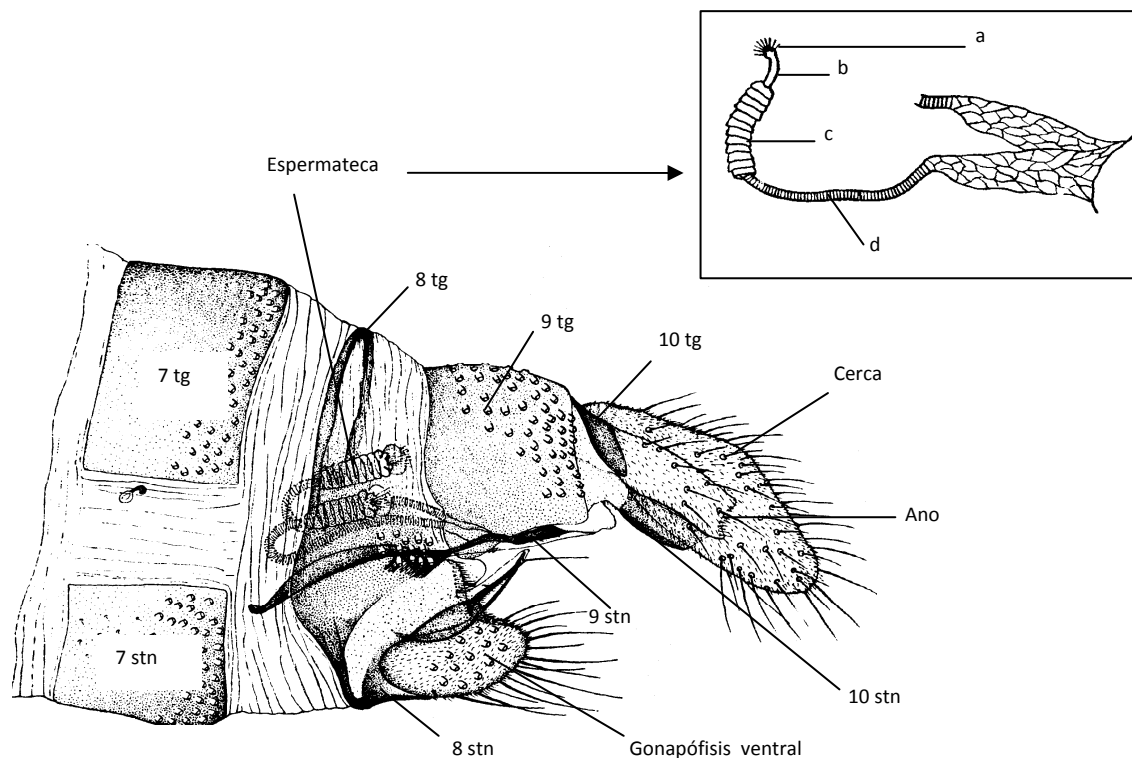


Figura 24. Abdomen terminal de hembra de *P. papatasi*. Espermateca de *P. ariasi*. tg, tergito; stn, esternito. Tomadas de Theodor (1958); Jobling (1987). Modificadas por el autor.

Abdomen terminal y estructuras genitales del macho de flebotomo:

En el macho los segmentos 7 y 8 se encuentran poco desarrollados. Por el contrario, los segmentos terminales (armadura genital externa) se encuentran muy evolucionados y a las 24-48 horas de la eclosión se da una rotación de 180° que hace que a partir del octavo fragmento los esternitos se dispongan dorsalmente y los tergitos en posición ventral (Abonnenc, 1972). De este modo, la genitalia está formada por dos apéndices laterales alargados (**coxitos**) que articulan con sendas prolongaciones llamadas **estilos**. En la porción distal de cada estilo se sitúan una serie de **espinas** cuya disposición y longitud son elementos empleados en la sistemática de diversas especies. De la base de los coxitos salen dos piezas ventrales denominadas **parámetros**, entre los cuales se observan unas estructuras fuertemente quitinizadas que reciben el nombre de **aedeagus** o valvas del pene. Estas valvas del pene se disponen rodeando el extremo terminal del **filamento genital** o canal eyaculador, el cual se prolonga al interior del abdomen para conectar con la **pompa genital**, que a su vez se encuentra ensamblada al **pinstón** (Fig. 25).

Finalmente, en posición ventral se disponen dos estructuras que reciben la denominación de **lóbulos laterales**, los cuales se hallan soldados a las **cercas** por su cara interna (Abonnenc, 1972; Morillas Márquez, 1981; Léger y Depaquit, 1999).

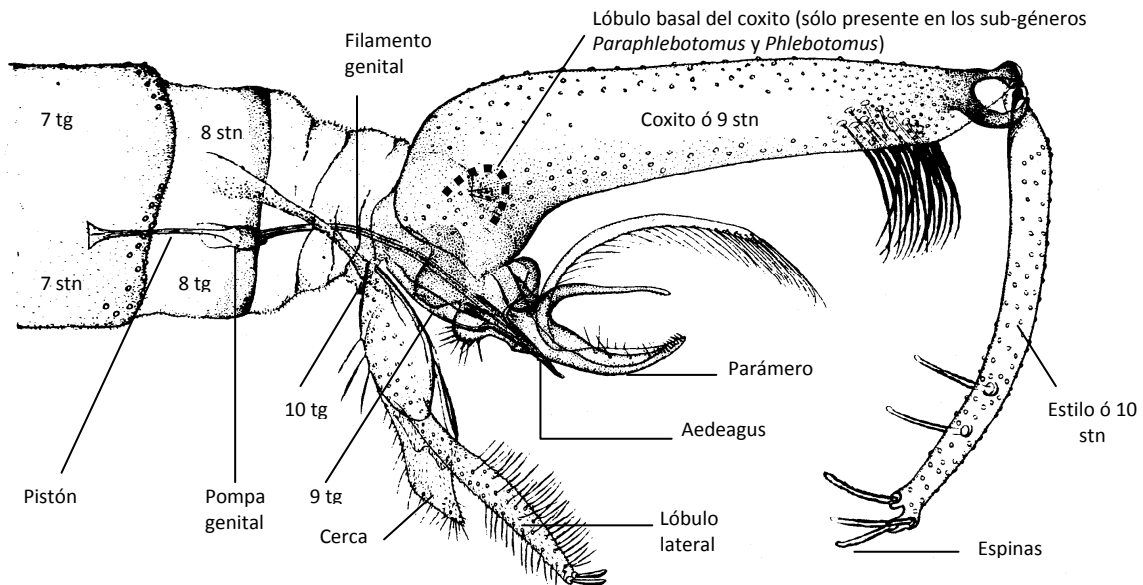


Figura 25. Abdomen terminal de macho de *P.papatasi*. tg, tergito; stn, esternito. Tomada de Jobling (1987). Modificada por el autor.

I.7.3. Caracteres morfológicos diferenciales de las especies descritas en España (Guevara-Benítez et al., 1978; Morillas-Márquez, 1981; Sanchis-Marín, 1986; Martínez-Ortega et al., 1987b; Gil-Collado et al., 1989; Gállego-Berenguer et al., 1992; Lucientes et al., 1994; Martínez-Ortega et al., 1996).

Como hemos descrito, 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* $\alpha > \beta$ (véase Fig. 22).

Género *Sergentomyia*; Sub-género *Sergentomyia*.

En la hembra cibarium armado con dientes dispuestos en fila recta y reservorio de la espermateca liso. En el macho estilo con 4 espinas, todas terminales o sub-terminales, y 1 seta no caduca.

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

Hembra: Cibarium armado con 20-85 dientes (Fig. 26) formando una empalizada compacta (45-80 en Granada) y ligeramente incurvados hacia atrás. Mancha pigmentaria marcada. Espermateca en forma tubular con la cabeza invaginada (Fig. 27), muy diferente a la de las especies del género *Phlebotomus*, y similar a la descrita en *S. fallax*.

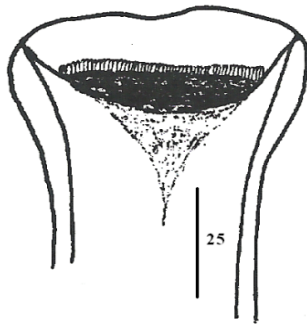


Figura 26.

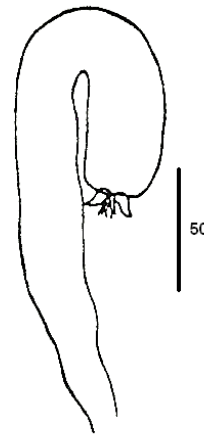


Figura 27.

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 (Fig. 28). Cibarium con 20 dientes de morfología y tamaño variable, dispuestos en un pequeño arco cóncavo (Fig. 29). Valvas del pene con forma característica en dedo de guante.

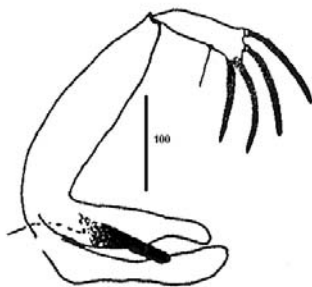


Figura 28.

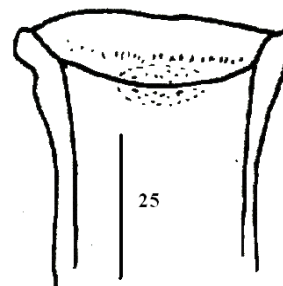


Figura 29.

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

Hembra: Cibarium armado con unos 20 dientes agudos, monomorfos y formando un arco cóncavo hacia atrás. Faringe con forma acorazonada, donde se observan una serie de dientes cuyo polimorfismo depende de su posición (Fig. 30). Espermateca tubular de tipo *S. minuta* (Fig.31).

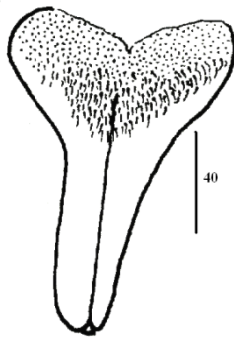


Figura 30.

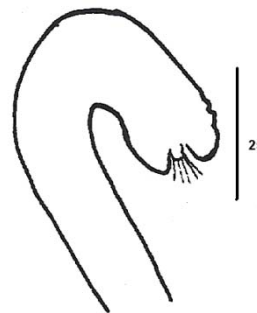


Figura 31.

Macho: Cibarium con 17 dientes agudos, monomorfos y dispuestos en arco cóncavo hacia atrás (Fig. 32). Mancha pigmentaria oscura, oval y con bordes regulares. Estilo largo con 4 espinas terminales y una seda no caduca terminal más pequeña que la de *S. minuta* (Fig. 33). Valvas del pene ligeramente incurvadas en el borde superior.

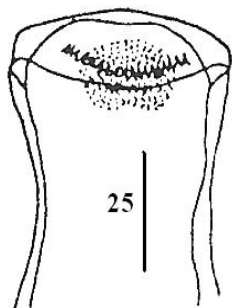


Figura 32.

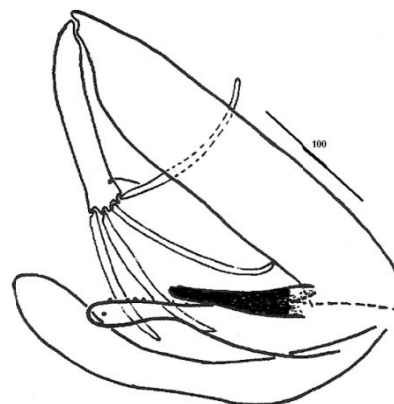


Figura 33.

Género *Phlebotomus*; Sub-género *Larrousius*.

Hembras con cabeza de la espermateca pedunculada y reservorios dilatados o divertículos en la base de los conductos espermáticos. Machos con estilo corto, presentado 5 espinas, dos de ellas terminales. Tufo de sedas en el coxito; éste no tiene lóbulo basal.

P. perniciosus Newstead, 1911.

Hembra: Espermatecas con 9-12 anillos de tamaño variable, cuello bastante largo, cabeza bien definida y conductos espermáticos estriados. Presentan un reservorio o divertículo en la base del conducto espermático con paredes espesas y refringentes (Fig. 34).

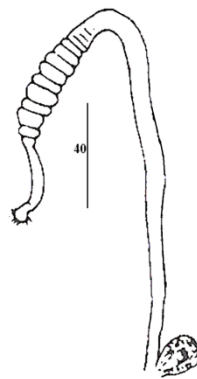


Figura 34.

Macho: Valvas del pene bifurcadas en dos puntas agudas de morfología variable (Fig. 35).

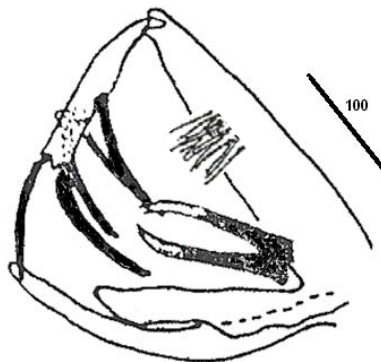


Figura 35.

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

En general, tamaño superior al de *P. perniciosus*.

Hembra: Espermateca con 12-14 anillos uniformes, cuello espermático corto y diámetro ligeramente inferior al de la cabeza (Fig. 36). Base del conducto espermático dilatada en forma de huso, pero sin divertículo. Boca inerte sin placa pigmentada. Faringe con pequeños pliegues irregulares (Fig. 37).

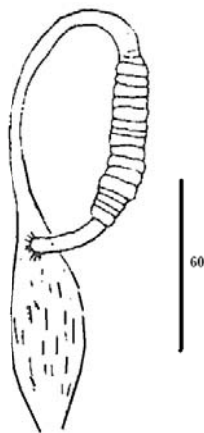


Figura 36.

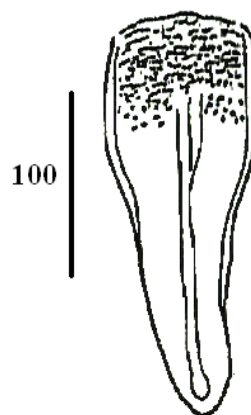


Figura 37.

Macho: De 16 a 32 sedas fuertes insertadas en el coxito. Valvas del pene en forma de badajo de campana (Fig. 38).

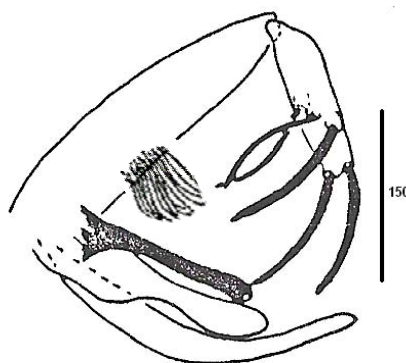


Figura 38.

***P. langeroni* Nitzulescu, 1930.**

Hembra: Reservorio de la espermateca constituido por 9-10 anillos, y conducto espermático terminado en dilatación fusiforme característica (Fig. 39).

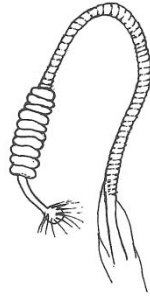


Figura 39.

Macho: Valvas del pene acabadas en una única punta cortada en bisel y asimétrica (Fig. 40).

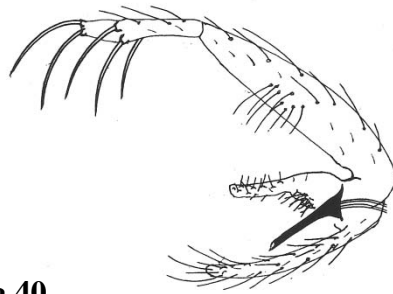


Figura 40.

Género *Phlebotomus*; Sub-género *Adlerius*.

Hembra con conductos espermáticos dilatados en la región próxima al reservorio, el cual no muestra anillos pero sí estriaciones transversales. Macho con estilo corto y 5 espinas, 2 de ellas terminales. Coxito sin lóbulo basal.

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

Hembra: Espermateca en forma de saco con profundas estriaciones, pero sin anillos diferenciados (Fig. 41).

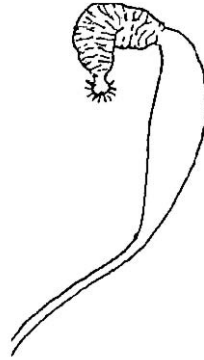


Figura 41.

Macho: Valvas del pene afiladas en forma de sable y terminadas en punta roma (Fig. 42).



Figura 42.

Género *Phlebotomus*; Sub-género *Paraphlebotomus*.

Hembra con conductos espermáticos anillados y sin modificaciones en su base, cabezas sesiles y armadura faríngea de aspecto reticulado. Macho con estilo corto y rechoncho, mostrando 4 espinas largas, 2 terminales. Tufo de sedas en el coxito sobre lóbulo basal.

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

Hembra: Espermoteca de 4 a 6 anillos. Anillo distal globuloso y sentado, con igual longitud que anchura (Fig. 43). Armadura faríngea con terminaciones apicales largas y sinuosas (Fig. 44).

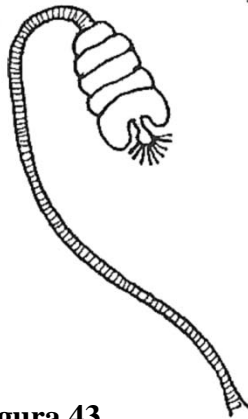


Figura 43.

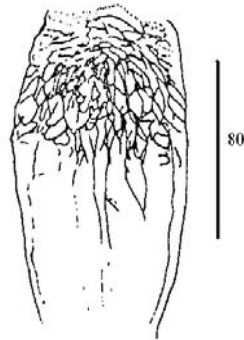


Figura 44.

Macho: Estilo rechoncho y muy corto con 4 espinas, dos terminales. Tufo de sedas cubriendo todo el lóbulo basal del coxito. Valvas del pene terminadas en punta e incurvadas hacia adentro o en “pico de rapaz” (Fig. 45).



Figura 45.

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

Tamaño ligeramente inferior a *P. sergenti*.

Hembra: Anillo distal de la espermateca (Fig. 46) casi aplanado respecto a *P. sergenti*. Aparece como un rodete circundando a la cabeza. Armadura faríngea apretada en el cuarto basal (Fig. 47).

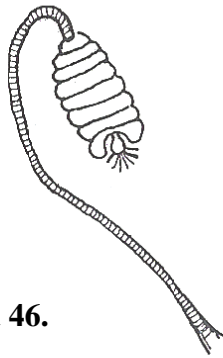


Figura 46.



Figura 47.

Macho: Estilo más alargado que el de *P. sergenti* con una única espina terminal. Lóbulo basal del coxito más redondeado que el de *P. sergenti* y rodeado por un tufo de numerosas y largas sedas (Fig. 48). Valva del pene con bordes casi paralelos y terminada en “proa de canoa”.

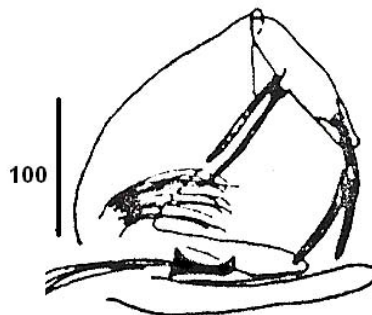


Figura 48.

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

Hembra: Anillo distal acampanado y pedunculado (Fig. 49). Armadura faríngea prolongada por los bordes hasta el tercio basal (Fig. 50).

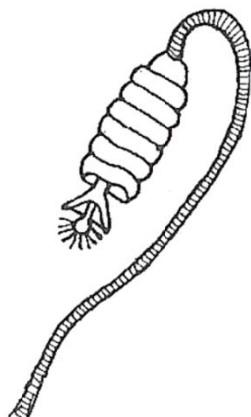


Figura 49.



Figura 50.

Macho: Estilo corto con 2 espinas terminales. Lóbulo basal del coxito más largo y estrecho que el de *P. sergenti* con 6-10 sedas (Fig. 51). Valvas del pene puntiagudas y transparentes en su extremo.

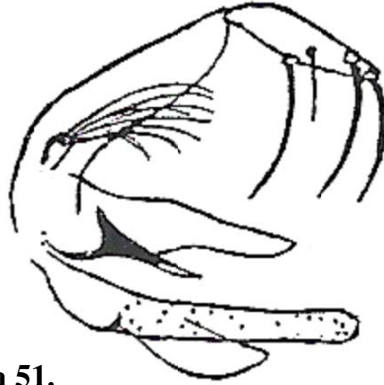


Figura 51.

Género *Phlebotomus*; Sub-género *Phlebotomus*.

Hembra con estructuras de la espermateca similares al sub-género *Paraphlebotomus*, y armadura faríngea de aspecto escamoso en filas transversas. Macho con estilo largo y delgado, presentado 5 espinas, 2 apicales.

P. papatasi Scopoli, 1786.

Hembra: Espermateca de 9 a 10 anillos y con la cabeza directamente unida al reservorio y abrazada por el último anillo (Fig. 52). Armadura faríngea escamosa con denticulaciones en la región basal (Fig. 53).

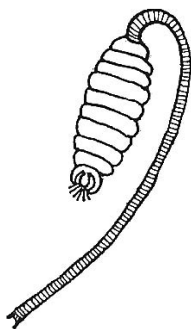


Figura 52.



Figura 53.

Macho: Genitalia mucho más desarrollada que las restantes 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 (Fig. 54). Valvas del pene en forma de puñal.

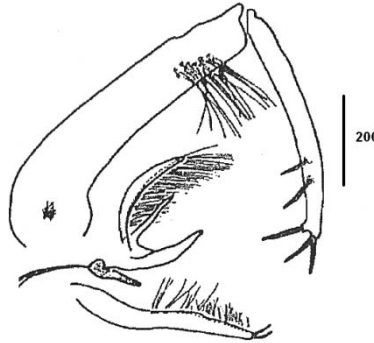


Figura 54.

Género Phlebotomus; Sub-género Abonnencius.

Hembras con espermatecas con largos conductos espermáticos. Machos con valva del pene tronco-cónica unida a una estructura aneja en forma de media luna y largos filamentos genitales.

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

Hembra: Espermatecas de forma tubular con paredes lisas y ligeramente más anchas que los conductos espermáticos, que son extremadamente largos. Cabeza pequeña y cuello poco definido (Fig. 55).

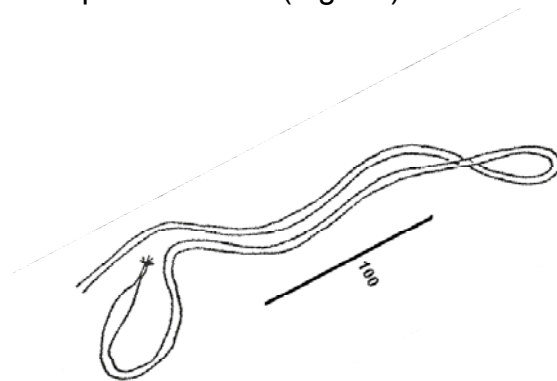


Figura 55.

Introducción

Macho: Faringe con finas estrías y cibarium inerme. Valvas del pene troncocónicas y con estructura aneja en forma de media luna (Fig. 56).



Figura 56.

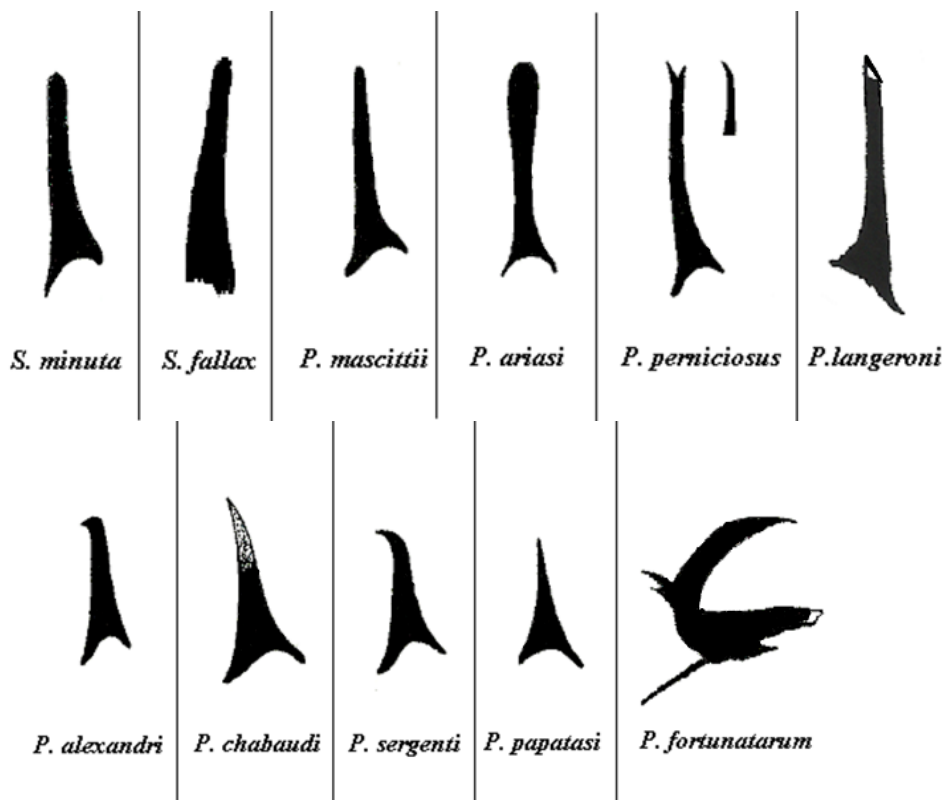


Figura 57. Aedeagus o valvas del pene de las especies de flebotomos descritas en España.

Imágenes 26 a 57 tomadas de Morillas-Márquez et al. (1984); Gil-Collado et al. (1989); Gállego-Berenguer et al. (1992); Martínez-Ortega et al. (1996). Modificadas por el autor.

I.8. Papel de la temperatura como factor climático en la dinámica de las enfermedades transmitidas por vectores.

Durante años se ha señalado que las condiciones medioambientales podrían afectar a la dinámica de ciertas enfermedades transmitidas por vectores (Colwell et al., 1998; Khasnis y Nettleman, 2005; Reiter, 2008; Shuman, 2010). Según López-Vélez y Molina-Moreno (2005) estos fenómenos podrían condicionar una serie de factores intrínsecos –relacionados con las interacciones entre el patógeno y el vector, hospedador intermediario o reservorio-, o extrínsecos –relativos a la acción directa de estos parámetros medioambientales sobre los patógenos, hospedadores o vectores-. Entre estos últimos, los cambios en la climatología podrían jugar un papel importante en la modificación de los patrones conocidos de distribución espacio-temporal y dinámica anual o interanual de patógenos, vectores, hospedadores y reservorios.

La temperatura es uno de los factores climáticos que podrían afectar a los distintos organismos implicados en el ciclo de vida de los patógenos transmitidos por vectores (Cross y Hyams., 1996; Sutherst, 2004; Boussaa et al., 2005; Khasnis y Nettleman, 2005; Prospero, 2006; Fischer, 2010). Se ha comentado que los incrementos de la temperatura pueden reducir el tiempo de incubación necesario para que el vector transmita al patógeno que transporta (periodo de incubación extrínseco). También se sabe que la actividad metabólica de estos vectores aumenta con dicho parámetro, llevándoles a alimentarse con mayor frecuencia. Sin embargo, no siempre los efectos de un incremento en la temperatura tienen consecuencias positivas para los vectores y/o patógenos. Un claro ejemplo sería el mencionado aumento del metabolismo, que acortaría la vida media de estos vectores y, en consecuencia, el tiempo durante el cual son transmisores activos (Githeko et al., 2000; Sutherst, 2004). Si por el contrario se redujese la temperatura, las larvas de ciertas especies pasarían a un estado de diapausa y numerosos ejemplares adultos morirían (Lafferty, 2009).

Varios autores defienden que dado el carácter heterotermo de los vectores, la temperatura afectará sobre todo al tamaño y diversidad de sus poblaciones (Githeko et al., 2000; Khasnis y Nettleman, 2005; Prospero, 2006). Diversos

estudios poblacionales de flebotomos parecen apoyar esta teoría (Cross y Hyams, 1996; Singh, 1999; Boussaa et al., 2005; Ready, 2008; Fischer et al., 2010,2011). Este fenómeno explicaría que en muchos casos la transmisión de los agentes patógenos siga una dinámica estacional (Cook, 1992) aunque dicho comportamiento por parte de los vectores también podría depender de las horas diarias de insolación, ya que es conocida su influencia sobre los procesos biológicos (Lafferty, 2009). Fischer et al. (2010) consideran que un descenso de las temperaturas en la época invernal, periodo durante el cual los flebotomos se hallan hibernando y protegidos de los cambios bruscos, no debería tener especial impacto sobre sus poblaciones. Por otro lado, un incremento de la temperatura en esta misma época podría traducirse en un aumento del periodo de actividad de los vectores (Githeko et al., 2000; Shuman, 2010). Para aportar mayor complejidad al tema tratado, no debemos olvidar que los flebotomos, como la mayoría de los vectores, son sensibles a las fluctuaciones de la temperatura dentro de unos límites superiores e inferiores de tolerancia (López-Vélez y Molina-Moreno, 2005). Algunos estudios parecen indicar que este rango de temperaturas podría ser un parámetro exclusivo en diversas especies de flebotomos (Cross y Hyams, 1996; Singh, 1999; Boussa et al., 2005).

La interacción de la temperatura con las demás variables medioambientales es intensa y compleja (Reiter, 2008). Un claro ejemplo sería su relación con las horas diarias de exposición solar, o el régimen de vientos reinante en la zona; todo ello dependiente de la orientación geográfica del área estudiada (Fischer et al., 2011). Por otra parte, la correlación existente entre temperatura y altitud –en ausencia de otros factores modificadores, como puede ser la mencionada orientación geográfica- es un hecho más que aceptado. Según Lafferty (2009) y Fischer et al. (2010) existe una asociación inversa entre la diversidad de vectores y la altitud, lo que afectaría a la variedad de enfermedades que éstos transmiten.

Para algunos autores las enfermedades transmitidas por vectores son inusuales o raras en los lugares de clima frío, mientras que en los trópicos, donde la variedad de vectores es superior, este tipo de enfermedades podrían estar favorecidas (Cook, 1992; Sutherst, 2004). Otros autores han defendido que

durante los meses más cálidos la mayoría de las regiones templadas del planeta alcanzan temperaturas tan altas como las registradas en los trópicos, y por tanto, durante estos meses y en presencia de los vectores adecuados, estos patógenos podrían establecerse en dichas localizaciones (Reiter, 2008). Sutherst. (2004) ha señalado que un hipotético incremento de las temperaturas a escala global debería tener menor impacto en áreas tropicales que sobre las regiones de clima moderado. Sin embargo, la capacidad natural de estas especies para adaptarse al entorno es un aspecto subestimado con mucha frecuencia (Sutherst, 2004; Lafferty, 2005; Reiter, 2008).

A pesar de todo lo indicado, existen otros factores no medioambientales que podrían provocar cambios en la distribución altitudinal y/o latitudinal de los vectores. En lo referente a la altitud, las elevaciones del terreno pueden constituir barreras físicas para su expansión (Cook, 1992; Fischer et al., 2010; Shuman, 2011; Fischer et al., 2011), mientras que la aparición de nuevos casos en latitudes septentrionales u otras regiones no endémicas podría deberse a la importación de animales, o a la inmigración de personas desde focos endémicos, así como a diversas cuestiones relativas a la actividad humana como las relacionadas con la evolución temporal de la calidad de vida (Colwell et al., 1998; Githeko et al., 2000; Ready, 2008). En cualquier caso, ambos grupos de factores, medioambientales o no, no son excluyentes y podrían actuar sinérgicamente sobre las poblaciones de vectores.

Los resultados obtenidos por el sub-proyecto EDEN (Emerging Diseases in a changing European eNviroment; Unión Europea) parecen indicar que los factores climáticos y relativos a la cobertura del terreno son parámetros explicativos de la abundancia de los flebotomos, aunque los estudios realizados al Este de Sudan apoyan la posibilidad de que estas variables explicativas sean diferentes entre unas regiones y otras (Ready, 2008; Franco et al., 2011).

La compleja red de interacciones que podrían estar asociadas a la aparición, desaparición o redistribución de estas enfermedades transmitidas por vectores avalan la necesidad de profundizar en el análisis de las distintas variables implicadas –medioambientales o no-, y aclarar cuál es su efecto sobre cada uno de los organismos que intervienen, ya sean patógenos, hospedadores o

vectores. La realización de estudios sobre poblaciones de vectores, en regiones concretas donde es posible recoger ciertas variables climatológicas, y la medición simultánea de otros factores de interés, podrían aportar nuevos datos sobre la evolución espacial y temporal de estas poblaciones. Así mismo, estas variables “interactivas” podrían incluirse en modelos predictivos de mayor envergadura o utilizarse en posteriores validaciones de dichos modelos.

OBJETIVOS

Con el objetivo general de **estudiar la leishmaniosis canina en el sudeste de España en las últimas dos décadas, identificar los factores de riesgo relacionados con la enfermedad y analizar la importancia del criterio diagnóstico en los resultados obtenidos** se han perseguido los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la evolución de las poblaciones de flebotomos durante los últimos 25 años y buscar posibles asociaciones con las variaciones de la temperatura ocurridas en el citado periodo. Determinar el papel de la temperatura como principal factor climático y las características ecológicas sobre la densidad de los vectores de *L. infantum*.
2. Estimar la seroprevalencia de la leishmaniosis canina y su evolución mediante la comparación con sendos estudios realizados hace 22 años, e identificar y verificar los factores de riesgo individuales asociados con la enfermedad.
3. Estudiar la influencia de la técnica de diagnóstico seleccionada, su umbral de positividad, las características epidemiológicas del entorno y otras particularidades de los animales sobre la prevalencia de leishmaniosis canina.
4. Proveer de una nueva PCR específica de *L. infantum* y valorar su capacidad para el diagnóstico de la leishmaniosis canina y humana, así como para la cuantificación de la carga parasitaria en diversos tejidos y situaciones clínicas.

RESULTADOS

Artículo 1

Canine Leishmaniasis in Southeastern Spain

**Joaquina Martín-Sánchez, Manuel Morales-Yuste, Carmen Acedo-Sánchez,
Sergio Barón, Victoriano Díaz, and Francisco Morillas-Márquez**

Author affiliations: Universidad de Granada, Granada, Spain (J.Martín-Sánchez, M. Morales-Yuste, S. Barón, V. Díaz, F. Morillas-Márquez); and Laboratorio de Análisis Veterinarios ANLAVE, Granada (C. Acedo-Sánchez)

Publicado en Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 15, No. 5, Mayo 2009: 795-798. DOI: 10.3201/eid1505.080969

Abstract

To examine prevalence changes and risk factors for canine leishmaniasis, we conducted a cross-sectional seroprevalence study and a survey during April-June 2006. Seroprevalence had increased at the meso-Mediterranean bioclimatic level over 22 years. Risk was highest for dogs that were older, large, lived outside, and lived at the meso-Mediterranean level.

Introduction

It has been suggested that climate change has the potential to change the transmission intensity of vector-borne diseases such as leishmaniasis, but supporting literature is lacking (1,2). Because long-term quality data on leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* and its vector (3–9) are available for the Alpujarras region of southeastern Spain (Figure 59), this is an ideal area for studying changes in the prevalence of canine leishmaniasis in a changing environment. Our study objectives were to determine whether any changes had occurred in the prevalence of canine leishmaniasis over 22 years and to identify risk factors for this disease.

The study

To achieve the first objective, we conducted a cross-sectional study in the Alpujarras from April through June 2006. We then compared current leishmaniasis seroprevalence data with data from 2 cross-sectional surveys conducted in 1984 and 1991 (3–5). The villages sampled for all 3 studies were similar and had been selected at random from within each of the 3 bioclimatic levels (thermo-, meso-, and supra-Mediterranean) that comprise the inhabited zone of the Alpujarras (Figure 59) (10). For each level, respectively, altitudes are 0–700, 600–900, and 900–1,800 m above sea level; annual mean temperatures are 17–19, 13–17, and 8–15°C; and annual rainfalls are 200–350, 600–1,000, and 1,000–1,600 inches. The dates for sample collection were set to coincide with organized events at which dogs were gathered (e.g., antirabies vaccination campaigns). All 3 surveys used indirect immunofluorescence for diagnosis; protocols and positivity threshold were identical. Dogs with a titer ≥ 160 were considered positive. To determine and compare the existence or lack of statistically significant differences between present and past prevalence rates, we used the χ^2 or Fisher exact test.

To achieve the second objective, we conducted a survey. The owners of the dogs included in the cross-sectional study conducted in the Alpujarras from April to June 2006 were asked to complete an epidemiologic record for each dog tested; data on the animal and its environment were recorded for subsequent use in univariate and multivariate logistic regression analyses (Tables 1, 2). Density data were included for 2 vectors, *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi* sandflies,

captured with sticky traps in June 2006 in the same villages in which the surveys were conducted.

No retrospective entomologic analysis was performed as had been done for canine leishmaniasis.

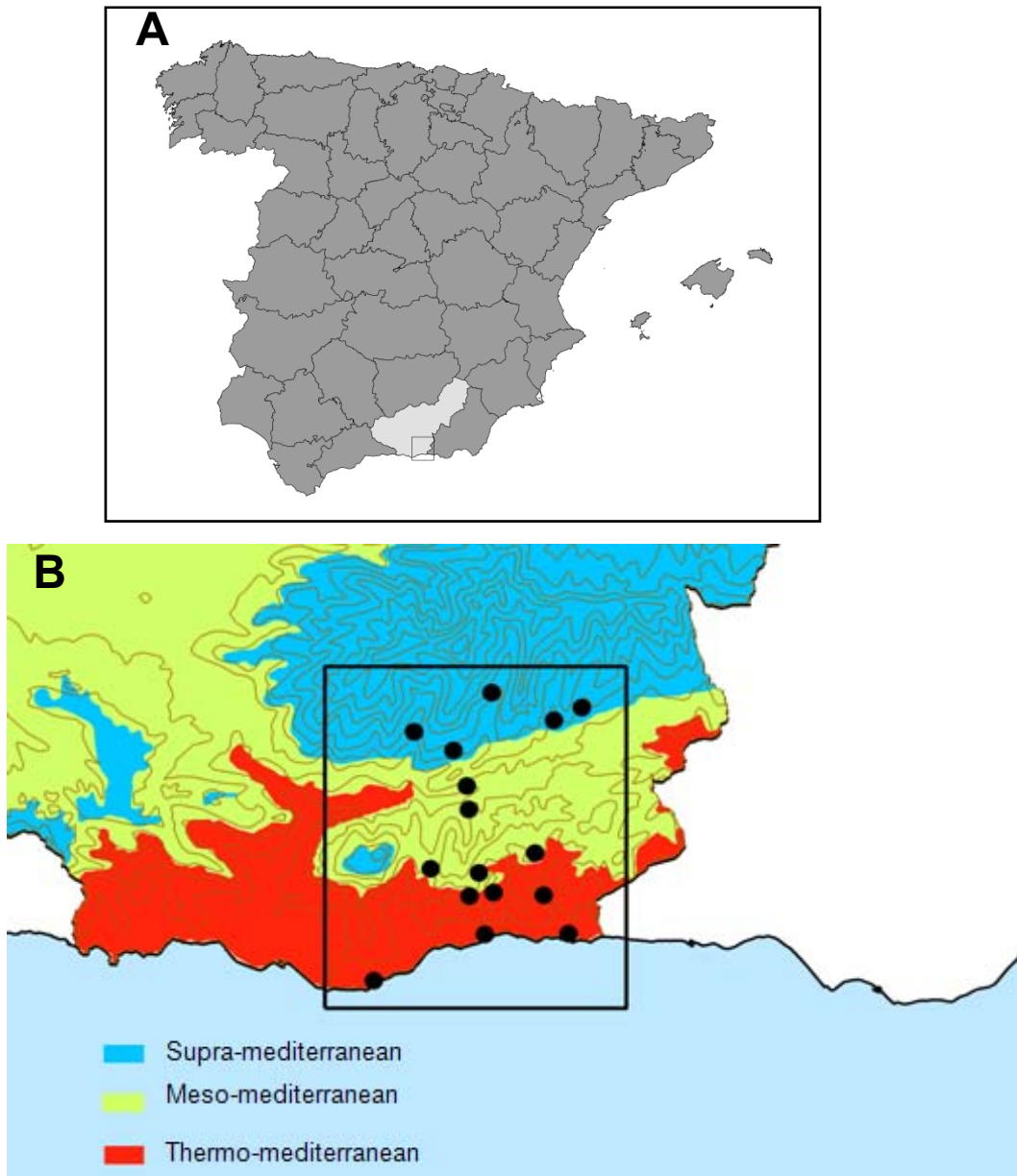


Figure 58. A) Location of the Alpujarras in southeastern Spain (37°00'–37°20'N and 3°00'–3°30'W). B) Bioclimatic levels (shading) and villages (black dots) where serum samples were collected from dogs to examine for leishmaniasis prevalence and sandflies were collected to estimate densities, April–June 2006. Of 1,675 sandflies captured, 269 were identified by morphologic appearance as *Phlebotomus perniciosus* (density 0–165 specimens/m²) and 22 as *P. ariasi* (0 and 11 specimens/m²).

Resultados

In our 2006 survey, 57 (13.0%) of 439 dogs had an antibody titer ≥ 160 (seroprevalence rate), 268 (61.0%) dogs had titers 20–80, and 114 (26.0%) had no titer. In terms of bioclimatic level, canine leishmaniasis seroprevalence was 20.1% at the meso-Mediterranean, 13.3% at the thermo-Mediterranean, and only 1.1% at the supra-Mediterranean levels. Statistically significant differences (χ^2 test $p < 0.001$) indicate that these differences are not random. The evolution-in-time analysis (Figure 60) shows how over 22 years (1984–2006), seroprevalence of canine leishmaniasis has progressively increased at the meso-Mediterranean level, climbing from 9.2% in 1984 to 15.4% in 1991 and finally to 20.1% in 2006 ($p = 0.015$); in contrast, no significant changes have taken place in global prevalence or in the other 2 bioclimatic levels studied (3–5; this study).

Dogs at greatest risk for canine leishmaniasis in the disease-endemic region of the Alpujarras were large dogs (>25 kg) and older dogs (>4 years) that worked as guard dogs or sheepdogs, slept outdoors, and lived at the thermo- or meso-Mediterranean level in a village such as Torvizcón, where the *P. perniciosus* density is ≥ 4 sandflies/m². Risk for these dogs was $54,571\times$ greater than for dogs that were kept as pets, were small, were <4 years of age, and slept inside a house in a village such as Mecina Bombarón or Pórtugos at the supra-Mediterranean level where *P. perniciosus* density is <4 sandflies/m².

Table 7. Possible factors associated with canine leishmaniasis, southeastern Spain*

Variables	No.dogs	% Dogs with canine leishmaniasis	Relative likelihood	P value
Bioclimatic level	439	13.0	-	0.005
Thermo-Mediterranean	210	13.3	Ref	-
Meso-Mediterranean	139	20.1	1.640	0.092
Supra-Mediterranean	90	1.1	0.073	0.011
Habitat	438	13.0	-	0.999
Rural	435	13.1	Ref	-
Urban/peri-urban	3	0.0	<0.001	-
Sex	435	12.4	-	0.178
Male	253	14.2	Ref	-
Female	182	9.9	0.662	-
Age, y	421	13.0	-	<0.001
≤4	232	9.5	Ref	-
>4	189	18.0	2.094	-
Weight, kg	405	13.6	-	0.048
≤25	316	11.9	Ref	-
>25	89	20.0	1.859	-
Fur length	349	15.5	-	0.069
Short/ medium	255	17.6	Ref	-
Long	94	9.6	0.494	-
Activity	439	13.0	-	<0.001
Pet	258	8.5	Ref	-
Hunting	133	15.0	1.899	0.052
Other†	48	31.3	4.876	<0.001
Location during daytime	373	15.3	-	<0.001
House	151	4.0	Ref	-
Outside	122	28.7	9.722	<0.001
In kennels	100	16.0	4.603	0.002
Location at night	435	13.1	-	0.001
Outdoors	186	19.4	Ref	-
Indoors	249	8.4	0.384	-
Travel away from home	438	13.0	-	0.461
No	396	12.6	Ref	-
Yes	42	16.7	1.384	-
Clinical signs of leishmaniasis	439	13.0	-	0.122
No	413	12.3	Ref	-
Yes	26	23.1	2.129	-
Fly protection	375	15.2	-	0.969
No	361	15.0	Ref	-
Yes	14	21.4	1.551	-
<i>Phlebotomus perniciosus</i> density	439	13.0	-	0.005
<4 sandflies/m ²	303	9.9	Ref	-
≥4 sandflies/m ²	136	19.9	2.254	-
<i>Phlebotomus ariasi</i> density	439	13.0	-	<0.001
<6 sandflies/m ²	383	10.7	Ref	-
≥6 sandflies/m ²	56	28.6	3.337	-

*Univariate analysis by logistic regression. Dogs considered to have canine leishmaniasis were those with antibody titer ≥ 160 . We investigated the existence of interaction and/or confusion between variables by constructing and comparing logistic regression models. The statistical analysis was performed using the software package SPSS 15.0 (www.spss.com). Confusion was noted between the location during daytime and location at night, so location during daytime was excluded from the multivariate analysis. No interaction was detected between any pair of independent variables. Ref, referent. †Guard dogs (n = 34), sheepdogs (n = 8), stray dogs (n = 4), dogs in kennel (n = 2).

Resultados

Table 8. Factors associated with canine leishmaniasis, southeastern Spain, final model*

Variables (no. dogs)	OR (95% CI)	p value
Bioclimatic level	-	0.001
Thermo-Mediterranean (189)	-	-
Meso-Mediterranean (134)	0.538 (0.196-1.476)	0.228
Supra-Mediterranean (82)	0.013 (0.001-0.126)	<0.001
Age, y	-	0.001
≤4 (224)	-	-
>4 (181)	3.223 (1.604-6.474)	-
Weight, kg	-	0.069
≤25 (316)	-	-
>25 (89)	1.985 (0.948-4.156)	-
Activity	-	0.00
Pet (232)	-	-
Hunting (129)	2.401 (1.060-5.442)	0.036
Other† (44)	4.831 (1.909-12.226)	0.001
Location at night	-	<0.001
Outdoors (229)	-	-
Indoors (176)	3.304 (1.704-6.406)	-
<i>Phlebotomus perniciosus</i> density	-	<0.001
<4 sandflies/m ² (277)	-	-
≥4 sandflies/m ² (128)	7.029 (2.632-18.769)	-

*Determined by multivariate logistic regression. With age as continuous variable (0.1–25 years, average 4.7 years), odds ratio (OR) = 1.142; with weight as continuous variable (2–60 kg, average = 17.7), OR = 1.047. CI, confidence interval.

†Guard dogs, sheepdogs, stray dogs, and dogs in kennels.

Conclusions

Among the drivers of global change that have the potential to influence vector-borne diseases, climatic and non-climatic (socioeconomic, demographic, and environmental) factors have been cited (1,2). Although it is not easy to attribute our findings—progressive increase in seroprevalence at the meso-Mediterranean level and drop and subsequent rise at the thermo-Mediterranean level (Figure 60)—to 1 or more drivers, we can attempt to find some form of association in the changes that have occurred in the Alpujarras throughout these 2 decades. Studies on climate change in Spain confirm a warming tendency (reflected at the global level), which provides evidence that temperatures have been increasing for a quarter of a century (11,12). Thus, we must assume that changes in temperature, rainfall, or humidity will have equally affected the 3 bioclimatic levels researched in the Alpujarras and may have influenced the spatial and temporal distribution and the seasonal dynamics of sandflies. An increase was

detected in the period of *P. perniciosus* activity in the region; these effects were probably more notable at the meso-Mediterranean level because this is where the density of this vector species is at its highest (6; Martín-Sánchez et al., unpub. data). During the time period researched, the human population remained constant in the Alpujarras; it has, however, progressively decreased in the disperse populations and increased in population centers. Unfortunately, no official figures for the canine population are available, although we were informed by staff of local town halls that in 1991, the 615 dogs analyzed accounted for $\approx 100\%$ of the total number of dogs registered in the villages sampled (3). The Alpujarras economy is based mainly on agriculture and livestock. One change during the period studied was the gradual disappearance of livestock enclosures in rural population centers. These enclosures appear to create a substantial risk for infection with *Leishmania* spp. (13,14) and are ideal places for sandfly blood sucking, mating, and oviposition (15).

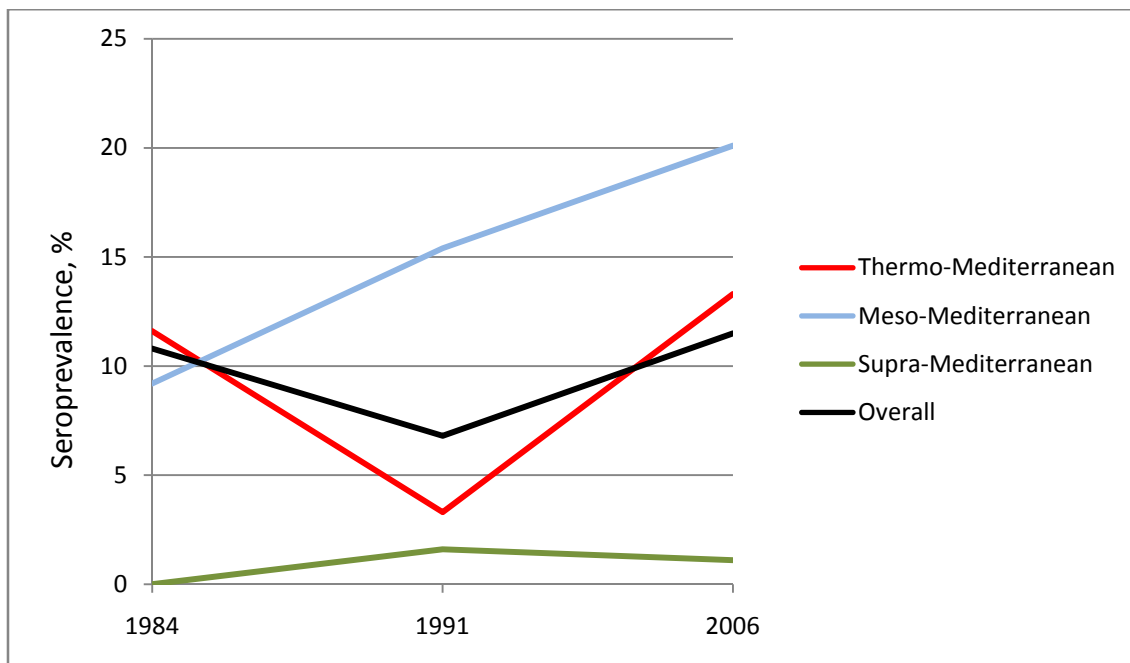


Figure 59. Canine leishmaniasis seroprevalence rates in the Alpujarras, Spain, 1984–2006, by time and bioclimatic level.

Resultados

With respect to risk factors, the increase in canine leishmaniasis seroprevalence as animal's age increases seems logical because in a leishmaniasis-endemic area, the greater the age, the longer the animal will have been exposed to sandflies and the greater the probability of having been bitten by an infected female sandfly. Seroprevalence of canine leishmaniasis also increases gradually with weight, which could be attributed to the vector being more attracted to larger animals. Dogs that sleep outdoors are at greater risk than those sleeping indoors because the density of the vector (*P. perniciosus*) is greater outdoors than inside a house. The association between *P. perniciosus* density and canine leishmaniasis seems logical, considering that *P. perniciosus* is the main vector species in the Alpujarras. This is the only species found to have been infected in this region (8,9), although *P. ariasi* is a proven vector in the nearby region of the Axarquía (13).

In the Alpujarras, the percentage of dogs kept as pets has increased from 42% in 1991 (3) to 59% in 2006 ($p < 0.001$). This increase corresponds to a general increase in standard of living and, along with other factors such as the disappearance of livestock enclosures from within population centers, would have acted to reduce transmission. Only the extension of the vector's activity period, which was detected at some trap sites, would have acted to increase transmission. Such extension of activity may be related to the increase in temperature brought about by climate change (11,12).

The Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid (AGL2004-06909-C02-02), and the Junta de Andalucía (group CVI176) provided financial assistance, and Emerging Diseases in a changing European eNvironment (EDEN; contract no. 010284, Integrated Project GOCE) awarded a PhD student grant to S.B. This publication is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0137 (www.eden-fp6project.net).

References

1. Kovats RS, Campbell-Lendrum DH, McMichael AJ, Woodward A, Cox JS. Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356: 1057–68.
2. Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17: 136–73. DOI: 10.1128/CMR.17.1.136-173.2004
3. Sánchez C, Martín Sánchez J, Vélez Bernal ID, Sanchís Marín MC, Louassini M, Maldonado JA, et al. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). *Int J Parasitol.* 1996; 26: 303–10. DOI: 10.1016/0020-7519(95)00124-7
4. Reyes Magaña A, Morillas-Márquez F, Valero-López A, González Castro J, Benavides-Delgado I, Sanchís Marín MC. Encuesta sobre la leishmaniosis canina en las comarcas naturales de la provincia de Granada (Sur de España). *Rev Iber Parasitol.* 1988; 48: 233–40.
5. Reyes Magaña A, Morillas Márquez F, Monts Ramirez E, Sanchís Marín MC, Benavides Delgado I, González CJ. La leishmaniosis en la provincia de Granada: estudio de la enzootia canina. *Ars Pharmaceutica.* 1989; 30: 35–44.
6. Morillas-Márquez F, Guevara-Benitez DC, Úbeda-Ontiveros JM, González CJ. Annual fluctuations of *Phlebotomus* populations (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Grenada (Spain) [in French]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1983; 58: 625–32.
7. Alcalde Alonso M, Morillas Márquez F, Delgado V, Naranjo R. Epidemiología de las leishmaniosis cutáneas en la provincia de Granada. *Actas Dermosifiliogr.* 1989; 80: 251–4.
8. Martín-Sánchez J, Guilvard E, Acedo-Sánchez C, Volf-Echeverri M, Sanchiz-Marín MC, Morillas-Márquez F. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *Int J Parasitol.* 1994; 24: 405–8. DOI: 10.1016/0020-7519(94)90089-2
9. Martín-Sánchez J, Gállego M, Barón S, Castillejo S, Morillas-Márquez F. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in

- sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100: 527–32. DOI: 10.1016/j.trstmh.2005.08.005
10. Rivas Martínez S, Bandullo JM, Serrada R, Allue Andrade JL, Monero del Burgo JL, González Rebollar JL. Memoria del mapa de series de vegetación de España. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, ICONA; 1987. p. 31–42.
11. Abanades García JC, Cuadrat Prats JM, de Castro Muñoz de Lucas M, Fernández García F, Gallastegui Zulaica C, Garrote de Marcos L, et al. El cambio climático en España. Estado de situación. Informe para el Presidente del Gobierno elaborado por expertos en cambio climático; 2007 [cited 2007 Dec 31]. Available from http://www.mma.es/portal/secciones/cambio_climatico
12. Vargas Yáñez M, García Martínez MC, Moya Ruiz F, Tel E, Parrilla G, Plaza F, et al. Cambio climático en el Mediterráneo español. Madrid: Impresos y Revistas, Instituto Español de Oceanografía, Ministerio de Educación y Ciencia; 2007. p. 32–41.
13. Morillas F, Sánchez Tabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, et al. Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog and vector. *Parasitol Res.* 1996; 82: 269–70. DOI: 10.1007/s004360050164
14. Moreira ED, de Souza VMM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, de Carvalho LP. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69: 393–7.
15. Killick-Kendrick R. Breeding places of *Phlebotomus ariasi* in the Cevennes focus of leishmaniasis in the south of France. *Parassitologia.* 1987; 29: 181–91.

Artículo 2

Changes in the population of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) vectors of leishmaniasis, and their relationship with the increase in temperature in South-East Spain.

**M. Morales-Yuste^a, F. Morillas-Márquez^a, M.C. Sanchiz-Marín^b, V. Díaz-Sáez^a,
S. Barón-López^a, J. Martín-Sánchez^a**

^a Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18011 Granada, Spain

^b Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Almería, 04071 Almería, Spain

Sometido en Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.
Marzo 2012.

Abstract

The influence that global warming may have on the development of vector-borne parasitic agents has been pointed out on numerous occasions. Based on this idea, a study was carried out on sandflies in South-East Spain, an area in which cases of human and canine leishmaniasis (CanL) arise every year. Specimens were captured using sticky traps over the period of April-October 2005. The capture sites were the same points as in previous studies conducted in 1978 (Granada) and 1982 (Almeria). In the analysis of the results we considered the total density of each species captured, the monthly variation of this density and its relationship with the variation in the average temperature of the area. Abundance, frequency, and activity period were taken into account.

The species *Sergentomyia minuta* has increased in density, abundance and activity period. *Phlebotomus perniciosus*, the main vector species of *Leishmania infantum* in the studied area, has fallen in density and abundance but increased in the activity period. *P. ariasi* has also shown a slight increase in the activity period. In terms of frequency, *P. ariasi* has dropped, *P. sergenti* has risen and *P. papatasi* has undergone the biggest rise. *P. alexandri* and *P. chabaudi* have fallen in density, abundance and frequency.

1. Introduction

Leishmaniasis are protozoan infections caused by the different species of *Leishmania* genus (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) and transmitted by sandflies (Diptera, Phlebotomidae). In Spain, leishmaniasis is endemic throughout the Mediterranean area and the centre of the country, where numerous cases of cutaneous and visceral human leishmaniasis have been reported, and co-infection with HIV has become a significant health problem in recent years. In all cases the responsible species is *L. infantum*. The main reservoir is the dog,¹⁻³ but the fox appears to play a significant role. *L. infantum* has also been reported in rats, and was recently found in equine population,⁴ cats,^{5,6} and some wild animals.⁷ The proven vectors of *L. infantum* in Spain are *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi*,⁸⁻¹² but *P. langeroni*, which is the vector in North Africa, has been identified in very restricted areas. *P. mascitti* also shows a limited distribution (North-Eastern Spain)

and its role as a vector has not been proven. *P. papatasi* and *P. sergenti* are two species widely spread throughout the Iberian Peninsula, but their abundance is not very high. Today those species are not considered to be significant vectors in the Iberian Peninsula because they transmit *Leishmania* species not found in Spain, namely *L. major* and *L. tropica*. Nevertheless, the considerable flow of migration into Spain from Maghreb, where both pathogens are endemic, could lead to the establishment of these species, particularly in the case of *L. tropica*, since it is anthroponotic. *P. alexandri* and *P. chabaudi* are distributed in the South-East of the Iberian Peninsula and their abundance is very low. The distribution map is completed by *Sergentomyia minuta*, the most ubiquitous and abundant species when the capture method are sticky traps, but it exhibits low or no preference for humans and its vectorial significance is considered as non-existent. Charrel et al. reported *S. minuta* infected by Toscana virus in the South of France.¹³

Global warming has been identified as one of the factors that could influence the development of diseases transmitted by arthropods,¹⁴⁻¹⁶ and more specifically leishmaniasis. An increase in temperature should promote a longer period of vector activity, an intensification of this activity, and a faster development inside the vector of the infectious agent which it transmits (or a reduction in the extrinsic incubation period).^{17,18} The Iberian Peninsula has undergone a clear temperature increase over the last 25 years, a phenomenon which has been particularly evident in the South-East.¹⁹⁻²¹ During this period, several authors have described increments in the distribution of sandflies.^{22,23} Since we have data available of sandfly captures from approximately 25 years ago,^{24,25} we repeated the sampling in this area using the same capture points in order to observe the changes that have occurred in sandfly populations.

2. Materials and Methods

2.1. Capture of sandflies

Sandflies were captured once a month over the period of April-October 2005 at thirteen sampling sites belonging to the provinces of Granada and Almeria (South-Southeast Spain). Those points were previously sampled in 1978 (Granada province) and 1982 (Almeria province).^{24,25} Few changes were observed in these

sites between sampling periods, and the same containment walls and holes could be used for placing the traps in 2005. The traps were paper sheets A4 coated with castor oil (sticky traps), and were kept in the holes for one week. The bioclimatic area where the sampling sites are located was also considered in the analysis, in accordance with Rivas-Martínez et al.²⁶ Seven sites are situated in the Mesomediterranean bioclimatic area (600-900 m above sea level, average annual temperature of 13-17°C, and rainfall of 600-1000 mm), four in Granada and three in Almeria; and six sites in the Thermomediterranean area (0-700 m above sea level, average temperature of 17-19°C, and rainfall of 200-350 mm), three in Granada and three in Almeria. The altitude of sampling sites ranged from 122 m to 830 m above sea level.

2.2. Mounting and classification of sandflies

The captured specimens were degreased with 96° alcohol, transparentized with Marc André solution,²⁷ and mounted in Berlese's medium.²⁸ Classification was carried out according to the morphological data provided by other authors.²⁹⁻³¹ Following the indications of Collantes and Martínez-Ortega,³² Martín-Sánchez et al.,³³ Pesson et al.³⁴ and Boussa et al.,³⁵ specimens classified in 1978/82 as *P. longicuspis*, and those captured in 2005 with the same characteristics, were considered *P. perniciosus*. No specimens of *P. chabaudi* or *P. riouxi* were captured in 2005,³⁶ so for this reason, *P. chabaudi* continues receiving the same name in accordance with the previous denomination of this species in Spain.^{37-40,25} Density (n° of specimens per square metre of trap), monthly variation of this density, and its relationship with the average temperature in each province and bioclimatic area was then determined. Abundance or prevalence (% of one species relative to the total number captured), frequency (n° of sampling stations in which a given species is found relative to the total number of sampled sites), and activity period (period of the year in which specimens of a given species were captured) were also included in the analysis. Data were calculated for each species and grouped by sampling station, bioclimatic level, province and year.

2.3. Temperature data

The average temperature used was supplied by the Spanish State Meteorological Agency, which provided us with medium, maximum and minimum

monthly temperatures of several weather stations located near the sampling sites: two at the Mesomediterranean and two at the Thermomediterranean of Granada for 1978 and 2005; and two at the Mesomediterranean and one at the Thermomediterranean of Almeria for 1982 and 2005. For the comparative studies we used an average of the media temperatures from weather stations grouping them in the same way we did with the sandflies (by sampling station, bioclimatic level, province and year). The average values of maximum and minimum temperatures were selected because they correlate closely with those of the average of media temperatures (Pearson correlation ≥ 0.954).

2.4. Statistical analysis

To determine and compare the existence or lack of statistically significant differences between present and past sandfly densities or abundances, we used the χ^2 or Fisher exact test. Univariate and multivariate linear regression analysis was performed to determine whether or not there was an association between the monthly variation in sandfly density and variations in temperature. Once confirmed that the assumptions of linear regression were satisfied (linear relationship, constant variance and normality), the model was constructed and an evaluation of confusion and interaction was realized. Finally, we proceed to interpreting the parameters and determining how accurately the model fits.

Statistical analysis was performed using the software package SPSS 15.0 for Windows. The significance level was set at 5%, although for less common species (*P. sergenti* and *P. papatasi*) it was considered appropriate to raise this to 10%.

3. Results

3.1. Diversity and density

Table 7 shows the absolute values (n) of the sandflies, density (d) and abundance (Abd) of each species grouped by bioclimatic level, province, and year of sampling. The species captured in the current study were *S. minuta*, *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. alexandri* and *P. Papatasi*. *P. chabaudi* is not included because although it was present in 1982, it was not found in 2005.

Resultados

The species with the highest density is *S. minuta*, for which we can see a clear increase in the study conducted in 2005 compared to those made in 1978/1982. This species has shown statistically significant differences (Table 8) in the total number captured ($p \leq 0.001$) in both provinces (Granada: $p \leq 0.001$; Almeria: $p = 0.045$), and in the Mesomediterranean area ($p = 0.01$), but no modification in density was recorded in the Thermomediterranean area ($p = 0.428$). Almost the exact opposite occurs with *P. perniciosus*, whose density has fallen in all the locations described, with statistically significant differences in the total number captured ($p = 0.005$) in Granada ($p \leq 0.001$), and in the Mesomediterranean area ($p \leq 0.001$). *P. ariasi* has also decreased in density in Granada ($p = 0.038$) and in the Mesomediterranean area ($p = 0.028$), while it remains constant without significant differences in the other locations, including in the total number captured ($p = 0.558$). The same happened with the species *P. sergenti*, *P. alexandri* and *P. papatasi*, without statistically significant differences in density ($p > 0.05$). However, if the significance level is raised to 10 %, which would be justifiable due to the low number of specimens captured, the density of *P. sergenti* would decline in the Mesomediterranean area ($p = 0.10$), and a similar reduction would occur with *P. papatasi* in the Thermomediterranean area ($p = 0.09$).

Resultados

Species	Thermomediterranean		Mesomediterranean		Granada		Almeria		Total
	1978-1982	2005	1978-1982	2005	1978	2005	1982	2005	
S.m.	n	4107	5213	2557	4149	11942	2515	2212	6664
	Abd	69.67	74.34	42.70	77.71	57.93	53.27	70.33	56.08
	d	70.60	89.88	49.67	144.79	109.70	35.02	39.15	60.78
P.p.	n	1304	1295	2540	1969	2281	2620	644	3844
	Abd	22.12	18.47	42.42	17.11	31.85	33.11	20.48	17.63
	d	22.42	22.33	49.34	31.89	60.31	21.77	11.40	35.06
P.a.	n	89	279	619	439	629	79	114	708
	Abd	1.51	3.98	10.34	3.82	8.78	1.67	3.62	5.96
	d	1.53	4.81	12.02	7.11	16.63	1.10	2.02	6.46
P.s.	n	104	158	257	133	96	265	101	361
	Abd	1.76	2.25	4.29	1.16	1.34	5.61	3.21	3.04
	d	1.79	2.72	4.99	2.15	2.54	3.69	1.79	3.29
P.al.	n	16	1	5	1	0	21	2	2
	Abd	0.27	0.01	0.08	0.01	0.00	0.44	0.06	0.18
	d	0.28	0.02	0.10	0.02	0.00	0.29	0.04	0.19
P.pa.	n	275	66	10	23	7	278	72	285
	Abd	4.66	0.94	0.17	0.20	0.10	5.89	2.29	2.40
	d	4.73	1.14	0.19	0.37	0.19	3.87	1.27	2.60
Total	n	5895	7012	5988	11506	7162	15373	3145	11883
	d	101.34	120.90	116.32	186.33	189.37	243.09	65.74	108.37

Table 9. Overall results. n: n° specimens in absolute values; Abd: abundance; d: density; S.m.: *Sergentomyia minuta*; P.p.: *Phlebotomus perniciosus*; P.a.: *Phlebotomus ariasi*; P.s.: *Phlebotomus sergenti*; P.al.: *Phlebotomus alexandri*; P.pa.: *Phlebotomus papatasi*.

Species	Thermo	Meso	Granada	Almeria	Total
S.m.	=	↑	↑	↑	↑
P.p.	=	↓	↓	=	↓
P.a.	=	↓	↓	=	=
P.s.	=	↓*	=	=	=
P.pa.	↓*	=	=	=	=

Table 10. Statistically significant changes occurred in the density of sandflies. ↑: density increases; ↓: density decreases; =: no significant differences; S.m.: *Sergentomyia minuta*; P.p.: *Phlebotomus perniciosus*; P.a.: *Phlebotomus ariasi*; P.s.: *Phlebotomus sergenti*; P.pa.: *Phlebotomus papatasi*; Thermo: Thermomediterranean; Meso: Mesomediterranean. Statistical significance of 5% and 10% (*).

3.2. Monthly variations in density of vector species and associations with changes in temperature, bioclimatic area and province

Figures 58A-58F illustrates the monthly variations between previous and current densities of the species considered *Leishmania* vectors: *P. perniciosus* and *P. ariasi*, vectors of *L. infantum*; *P. sergenti* for *L. tropica*; and *P. papatasi* for *L. major*. Variations in temperature between these years are also displayed. A clear increase in temperature has occurred in all months except in September (Granada) and in October (Almeria), but this has not resulted in an overall increase in the density of vector species populations.

With the aim to determine whether there is any association between the changes undergone in both parameters, a linear regression analysis was carried out. Dependent variable was the variation in density of the two *L. infantum* vector species, *P. perniciosus* and *P. ariasi*, both jointly ($\Delta d(P.p.+P.a.)$) and separately ($\Delta dP.p.$ and $\Delta dP.a.$). As independent variables we used the increase in temperature (ΔT) and other variables that could affect the relationship between these variables (bioclimatic area and province). Each one of the possible modifying variables had two categories, Thermomediterranean (reference) and Mesomediterranean for the bioclimatic area, and Granada (reference) and Almeria for the province.

The coefficients of determination (R^2) obtained with the finally retained multiple linear regression models were 0.391, 0.464 and 0.316 respectively, and representative equations are as follows:

$$\Delta d(P.p.+P.a.) = 42.664 - 20.583 \times \Delta T - 102.789 \times \text{bioclimatic area} + 25.261 [\text{bioclimatic area} \times \Delta T] - 51.795 \times \text{province} + 60.871 [\text{province} \times \text{bioclimatic level}] + 12.645 [\text{province} \times \Delta T]$$

$$\Delta dP.a. = 14.135 - 4.842 \times \Delta T - 26.310 \times \text{bioclimatic area} + 3.952 [\text{bioclimatic area} \times \Delta T] - 13.177 \times \text{province} + 21.908 [\text{province} \times \text{bioclimatic level}] + 3.056 [\text{province} \times \Delta T]$$

$$\Delta dP.p. = 28.530 - 15.741 \times \Delta T - 76.480 \times \text{bioclimatic area} + 21.309 [\text{bioclimatic area} \times \Delta T] - 38.618 \times \text{province} + 38.963 [\text{province} \times \text{bioclimatic level}] + 9.589 [\text{province} \times \Delta T]$$

The variable $\Delta d(P.p.+P.a.)$ has a minimum value of $-108.73 P.p+P.a./m^2$ and a maximum of $102.72 P.p+P.a./m^2$, with an average value of $-16.84 P.p+P.a./m^2$. Considering only *P. perniciosus* ($\Delta dP.p.$) these values are $-95.95 P.p./m^2$, $76.30 P.p./m^2$ and $-14.87 P.p./m^2$ respectively, and $-35.08 P.a./m^2$, $26.42 P.a./m^2$ and $-1.97 P.a./m^2$ in the case of *P. ariasi* ($\Delta dP.a.$). ΔT varies between -2.20°C and 6.65°C , with an average temperature of 1.88°C , and the model can only be interpreted within this range. The negative value of coefficient β indicates a decreasing association between variation in density and variation in temperature. The bioclimatic area and the province act as modifying variables of variation in temperature, and the province in turn acts as a modifying variable of bioclimatic level, so these three interactions must be considered. Therefore, for each degree of increase in temperature, the densities of *P. perniciosus* and *P. ariasi* will be altered in a different way depending on the bioclimatic area and the province involved.

Thermomediterranean Granada: 1978/2005

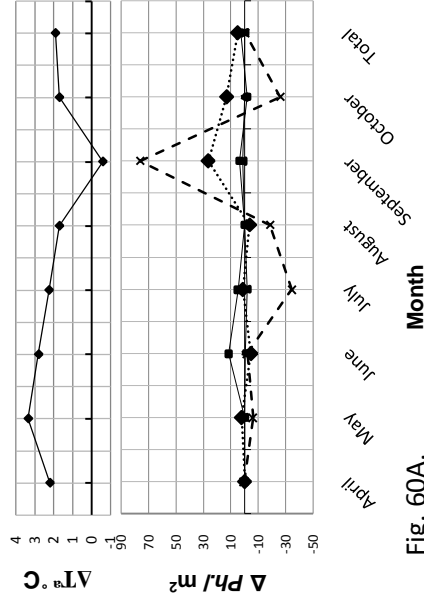


Fig. 60A.

Mesomediterranean Granada: 1978/2005

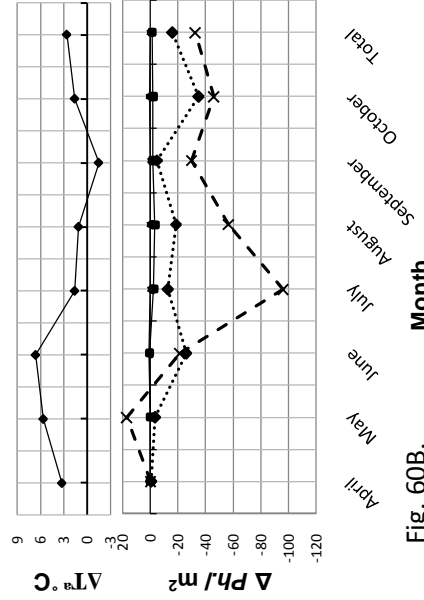


Fig. 60B.

Global Granada: 1978/2005

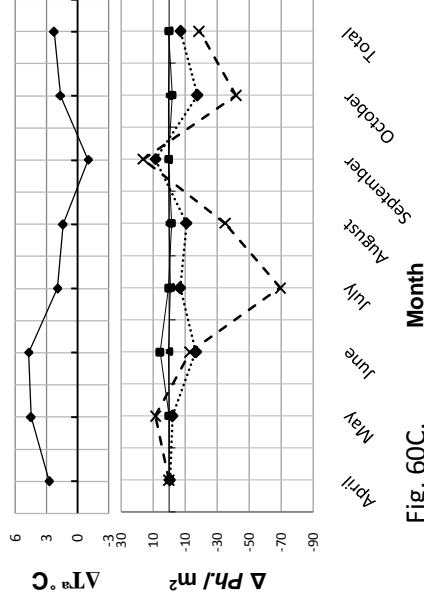


Fig. 60C.

Thermomediterranean Almeria: 1982/2005

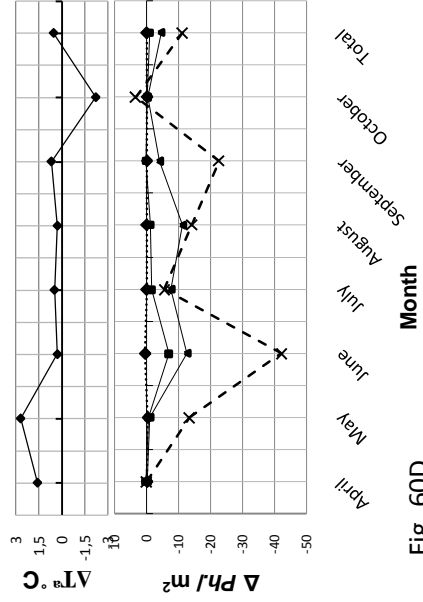


Fig. 60D.

Mesomediterranean Almeria: 1982/2005

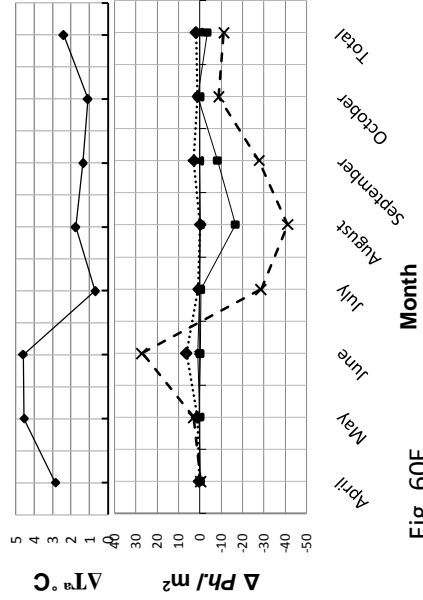


Fig. 60E.

Global Almeria: 1982/2005

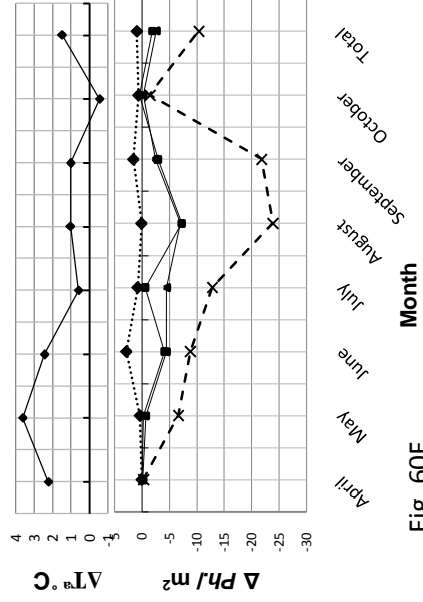


Fig. 60F.

Figures 60A-60F. Monthly variation in the density of vector sandflies and in the average temperature between the years 1978/2005 (Granada province) and 1982/2005 (Almeria province). Changes described correspond to the difference between 2005 data and the values obtained in the preceding studies. $\Delta T^{\circ}C$: Temperature increase expressed in degrees Celsius; $Ph./m^2$: *Phlebotomus* per m^2 ; *P. perniciosus*: dashed line with cross; *P. ariasi*: dotted line with rhombus; *P. sergenti*: solid line with square and *P. papatasi*: solid line with triangle.

3.3. Abundance and frequency

The abundance (Table 7) has clearly increased for *S. minuta* in all the locations surveyed ($p < 0.05$), leading to a general drop in all other species. However, there was an increase of *P. ariasi* in the province of Almeria, and in the Thermomediterranean area ($p < 0.001$). An increase in abundance was also observed in the Thermomediterranean area for the species *P. sergenti* ($p = 0.06$).

The frequency (Table 9) shows no variation for *S. minuta* and *P. perniciosus*, and both species were found in all the sampling stations and years. *P. ariasi* has decreased in frequency since it was found in two sites less in 2005, whilst *P. sergenti* has increased. The greatest changes have occurred with *P. papatasi*, which is now found in all the stations (six stations more than in previous studies). *P. alexandri* and *P. chabaudi* have also fallen, especially the first one. *P. chabaudi* was not found in 2005.

Species	Granada		Almeria		Total	
	1978	2005	1982	2005	1978/82	2005
S.m.	7/7	7/7	6/6	6/6	13/13	13/13
P.p.	7/7	7/7	6/6	6/6	13/13	13/13
P.a.	7/7	5/7	5/6	5/6	12/13	10/13
P.s.	5/7	6/7	6/6	6/6	11/13	12/13
P.pa.	2/7	7/7	5/6	6/6	7/13	13/13
P.al.	0/7	0/7	5/6	2/6	5/13	2/13
P.ch.	0/7	0/7	1/6	0/6	1/13	0/13

Table 11. Variation in frequency of sandflies in the provinces of Granada and Almeria. Note the great variation in *P. papatasi*. S.m.: *Sergentomyia minuta*; P.p.: *Phlebotomus perniciosus*; P.a.: *Phlebotomus ariasi*; P.s.: *Phlebotomus sergenti*; P.pa.: *Phlebotomus papatasi*; P.al.: *Phlebotomus alexandri*; P.ch.: *Phlebotomus chabaudi*.

3.4. Activity period

The activity period of the species captured shows notable differences, revealing a general increase, particularly in the month of the first appearance (Table 10). *S. minuta* appeared in April in three sampling stations in 1978/82, while during the same month in 2005 it was located in ten places. A similar modification was observed with *P. perniciosus* in May: found in six sites in 1978/82 compared to 2005, eleven places. Less marked differences were noted with the other

Resultados

species. Regarding the last months of capture, the greatest differences were obtained with *P. perniciosus*, being captured in 2005 on all thirteen sites during the month of October, whilst in the sampling rounds of 1978/82 it was captured on ten sites and in three stations in September. *P. ariasi* showed the opposite tendency: it was present in October 1978/82 on eight sampling sites but only in five locations in 2005.

Species	Start of sandfly captures						End of sandfly captures			
	April		May		June		September		October	
	78/82	2005	78/82	2005	78/82	2005	78/82	2005	78/82	2005
S.m.	3	10	5	3	5	-	2	1	11	12
P.p.	2	2	6	11	5	-	3	-	10	13
P.a.	3	4	5	3	2	1	3	4	8	5
P.s.	1	1	1	2	2	4	-	3	4	4
P.pa.	1	1	2	1	2	1	2	2	4	1

Table 12. Changes in the activity period of sandflies captured in the southeast of Spain. *S.minuta* and *P. perniciosus* have clearly started to appear earlier. S.m.: *Sergentomyia minuta*; P.p.: *Phlebotomus perniciosus*; P.a.: *Phlebotomus ariasi*; P.s.: *Phlebotomus sergenti*; P.pa.: *Phlebotomus papatasi*.

4. Discussion

Several authors have suggested that global warming could lead to an increase in vector populations, and consequently the probability of transmitting the species which they carry.^{41,3,18} Our study was conducted in an area and for a period of time (provinces of Granada and Almeria in South-Southeast Spain during 25 years) in which climatic conditions have undergone considerable changes. Most notable examples of these variations are a clear increase in temperature, daily insolation time, and a marked reduction in rainfalls.¹⁹⁻²¹ However, these predictions have not been clearly manifested in our results, because some of the parameters, such as the density of sandflies, have changed very little, others like activity period have increased, and others have risen in some species and decreased in others -case of frequency-.

In the area studied, leishmaniasis is caused only by *L. infantum*, and the vector species are *P. perniciosus* and *P. ariasi*. *P. perniciosus* is found throughout

the Western Mediterranean, and has been considered until now a species with greater affinity for semi-arid environments.^{42,43} This means that the increase in temperature and drop in rainfall in this area should have created favourable conditions to induce an increase in its density, but the reality is different: although density has decreased, the activity period for this species has undergone a clear increase. A similar phenomenon has occurred with *P. ariasi*. This species has a higher affinity for humid environments and is found at its maximum density in Cevennes, France.⁴⁴ Therefore, climatic change in our area should reduce its presence, but this reduction only occurred in the Mesomediterranean area and in the province of Granada (in terms of statistical significance).

Over the 25 years between the two studies, *P. perniciosus* and *P. ariasi* densities have remained constant in the Thermomediterranean area and have fallen in the Mesomediterranean area. Thus, whilst in 1978 these densities were higher in the Mesomediterranean area than in the Thermomediterranean one ($p=0.027$ and $p=0.024$ respectively), in 2005 the values are similar ($p=0.881$ and $p=1.0$ respectively). The mathematical models obtained allow us to make predictions on changes in density for these vector species with hypothetical increases in temperature related to climatic change. A temperature increase of 1°C would not have the same effects on *P. perniciosus* or *P. ariasi* density in the Thermomediterranean area than in the Mesomediterranean one, and it would also be different for Granada and Almeria. In the specific case of *P. perniciosus*, the resulting model predicts that density will increase in the Granada Thermomediterranean (+ 12 P.p./m²), will reduce considerably in the Granada and Almeria Mesomediterranean (-42.4 P.p./m² and -32.4 P.p./m² respectively) and with less intensity in the Almeria Thermomediterranean (-16.2 P.p./m²). On the other hand, a hypothetical increase of 2°C would cause a reduction in density in all locations, including in the Granada Thermomediterranean.

The influence of ecological and bioclimatic characteristics on the transmission of leishmaniasis is revealed by the varying seroprevalence of Canine Leishmaniasis (CanL) at the different bioclimatic levels and its evolution over the course of time. Therefore, CanL prevalence rates in the Granada Thermomediterranean and Mesomediterranean were equal ($p=0.459$) in 1984, while in 2006 they are significantly higher than those obtained in 1991 ($p<0.005$).

Resultados

During the period 1984-2006, CanL seroprevalence progressively increased in the Granada Mesomediterranean, rising from 9.2% in 1984 to 15.4% in 1991, and 20.1% in 2006. In the Thermomediterranean it experienced a drop and a subsequent rise to finish in 2006 with a similar value to that obtained in 1984.² It is possible that the prolongation of the activity period of the vectors would have had a greater effect on the transmission of the disease than on the overall reduction described in density. In the Granada Mesomediterranean, where there was a progressive increase in canine leishmaniasis, *P. perniciosus* shows a clear increase in density in May, with values from 1.6 P.p./m² in 1978 to 19.8 P.p./m² in 2005. If we also consider *P. ariasi*, the increase in density range from 23.5 P.a./m² to 36.9 P.a./m² (Table 11).

	1978			2005		
	T ^a	dP.p.	d(P.p.+ P.a.)	T ^a	dP.p.	d(P.p.+ P.a.)
Thermomediterranean	17.5	28.8	35.5	20.8	22.5	31.6
Mesomediterranean	14.1	1.6	23.5	19.8	18.5	36.9

Table 13. Variations in average temperature in the Thermo- and Mesomediterranean of Granada and in the density of *Phlebotomus perniciosus* (dP.p.). It also includes changes in densities of the two proven vector species (*Phlebotomus perniciosus* combined with *Phlebotomus ariasi* or d(P.p.+P.a.)). Data being compared are relative to May 1978 and 2005.

P. papatasi and *P. sergenti* are widely distributed in Spain,^{30,31} but their densities are lower than *P. perniciosus*. Both species have a marked preference for arid environments, so an increase in their populations would be expected. However, density of *P. Sergenti* has decreased in the Mesomediterranean and remained stable in all other locations. A similar phenomenon occurred with *P. papatasi* density, which has only fallen in the Thermomediterranean. *P. papatasi* has also undergone the most significant change in frequency, which could be related to climatic influence, and *P. sergenti* frequency has hardly changed. No significant variations were detected in the activity period of these two species. A surprising fact has been that *P. alexandri* and *P. chabaudi*, species belonging to an arid climate, far from increasing in density or frequency, have markedly reduced these parameters.

Regarding *S. minuta*, with similar distribution to *P. perniciosus*, is the species which has undergone the greatest increase in density (with significant differences) and abundance in our study. This increased abundance has led to a reduction in this parameter for other species. Its activity period has also increased, whilst its frequency has remained constant, like *P. perniciosus*, as it was found in all the sampling sites.

In summary, although climatic change has been recorded in this area in the last 25 years, there are other factors influencing sandfly populations which are directly related to human activity as those indicated by Barón et al.⁴⁵ and Gálvez et al.,¹⁸ and the increase in temperature is only another piece in the complex puzzle relative to the maintenance and dissemination of this vector-borne disease.⁴⁶

Authors` disclaimers: The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessary reflect the views of the “Ministerio de Educación y Ciencia” and “Junta de Andalucía”.

Authors` contributions: FMM, JMS and MCSM conceived and designed the study protocol; MCSM, FMM, MMY and SBL carried out the sampling and mounting of sandflies; the classification was done by FMM, MMY and VDS; statistical data was provided by JMS; FMM, JMS and MMY drafted the manuscript. FMM is guarantor of the paper.

Funding: This investigation received financial support from the “Ministerio de Educación y Ciencia” (Madrid, Spain) by the Projects AGL2004-06909-C02-02/GAN and CGL2007-66943-C02-02/BOS; and from the “Junta de Andalucía” (Sevilla, Spain) by subsidizing the group CVI176.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

1. Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2004;**23**:661-76.
2. Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón-López S, Díaz-Sáez V, Morillas-Márquez F. Canine leishmaniases in Southeastern Spain.

- Emerg Infect Dis* 2009;**15**:795-8.
3. Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, et al. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (Central Spain). *Vet Parasitol* 2010;**169**:327-34.
 4. Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Serra R, Gállego M, Ramis A, Fondevila D, et al. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet J* 2003;**35**:320-3.
 5. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol* 2007;**145**:267-73.
 6. Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol* 2010;**174**:336-40.
 7. Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, et al. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 2008;**155**:198-203.
 8. Rioux JA, Guilvard E, Gállego J, Moreno G, Pratlong F, Portús M, et al. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, et *P. perniciosus* Newstead, 1911, vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer. In: *Leishmania*, Taxonomie et phylogénèse. Application éco-épidémiologiques. *Edit. Coll Int CNRS/INSERM*; 1986, Montpellier. France; 439-44.
 9. Martín-Sánchez J, Guilvard E, Acedo-Sánchez C, Wolf-Echeverri M, Sanchiz-Marin MC, Morillas-Marquez F. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *Int J Parasitol* 1994;**24**:405-8.
 10. Morillas-Márquez F, Sánchez-Rabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, et al. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog and vector. *Parasitol Res* 1996;**82**:569-70.

11. Molina R, Lohse JM, Pulido P, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Infection of sand flies by human coinfecting with *Leishmania infantum* and Human Immunodeficiency Virus. *Amer J Trop Med Hyg* 1999;**60**:51-3.
12. Alcover MM, Gramiccia M, Di-Muccio T, Ballart C, Castillejo S, Picado A, et al. 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 leishmaniasis. *Parasitol Res* 2012. <http://www.springerlink.com/content/51207282836p7016/fulltext.pdf> [accessed 10 March 2012]
13. Charrel RN, Izri A, Temman S, Lamballerie X, Parola P. Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* flies. *Emerg Infect Dis* 2006;**12**:1299-300.
14. López-Vélez R, Molina R. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. *Rev Esp Sal Publ* 2005;**79**:177-90.
15. Ready P. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2008;**27**:399-412.
16. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di-Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, et al. 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 Trop* 2008;**105**:158-65.
17. De-La-Rocque S, Rioux JA, Slingenbergh J. Climate change: effects on animal diseases systems and implications for surveillance and control. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2008;**27**:339-54.
18. Gálvez R. Mapping of the current distribution and predicted spread of the leishmaniasis sandfly vector in Madrid region (Spain) based on experimental variables and expected climate change. *Vect Born Zoonot Dis* 2011;**11**:799-806.
19. Trigo R, Paredes D, García-Herrera R, Trigo I. The changing nature of the precipitation regime in the Iberian Peninsula. *Geophysical Research Abstract*, 8.

Resultados

- General Assembly of the European Geosciences Union; April 2006; Viena. Austria.
20. Martín-Vide J, Calbó J, Sánchez-Lorenzo A. Tendencias recientes de la insolación en la España peninsular y Baleares (1971-2000). 5ª Asamblea Hispano-Portuguesa de Geodesia y Geofísica; 30 Enero-2 Febrero 2006; Sevilla. España; 1-4.
21. Martín-Vide J, Llebot-Rabagliati JE, Padilla-Rosa E, Alcántara-Escolano V. Aspectos económicos del cambio climático en España. Edit. Caixa Catalunya, Estudios; 2007, Barcelona. España; 83.
22. Aransay AM, Testa JM, Morillas-Márquez F, Lucientes J, Ready PD. 2004. Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol Res* 2004;**94**:416-20.
23. Ballart C, Barón S, Alcover MM, Portús M, Gállego M. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta Trop* 2012;**122**:155-9.
24. Morillas-Márquez F, Guevara-Benítez DC, Úbeda-Ontiveros JM, González-Castro J. Fluctuations annuelles des populations de phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). *Ann Parasitol Hum Comp* 1983;**58**:625-32.
25. Sanchis-Marin MC, Morillas-Márquez F, González-Castro J, Benavides-Delgado I, Reyes-Magaña A. Dinámica estacional de los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae) de la provincia de Almería (España). *Rev Iber Parasitol* 1986;**46**:285-91.
26. Rivas-Martínez S, Bandullo JM, Serrada R, Allúe-Andrade JL, Monero-Burgo JL, González-Rebollar JL. Memoria del mapa de series de vegetación de España. Serie técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Edit. ICONA; 1987, Madrid. España; 268.
27. Abonnenc E. Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). *Memoires ORSTOM*, Paris: 1972;**55**:1-289.

28. Lewis DJ. Phlebotomidae and Psychodidae (sandflies and mothflies). In: Insects and others arthropods of medical importance. Edit. K.G.V. *Smith British Mus Nat Hist (Ent)*, London; 1973,155-79.
29. Leger N, Pesson B, Madulo-Leblond G, Abonnenc E. Sur la differentiation des femelles du sous-genre *Larrousius* Nitzulescu, 1931 (Diptera, Phlebotomidae) de la région méditerranéenne. *Ann Parasitol Hum Comp* 1983;**58**:611-23.
30. Gil-Collado J, Morillas-Márquez F, Sanchís-Marín MC. Los flebotomos en España. *Rev San Hig Pub* 1989;**68**:15-34.
31. Gállego J, Botet J, Gállego M, Portus M. Los flebotomos de la España Peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. In: "In memoriam" Prof. F. P. Martínez Gómez. Edit. Universidad de Córdoba, Spain; 1992,579-600.
32. Collantes F, Martínez-Ortega E. Sobre la validez taxonómica de *Phlebotomus longicuspis* (Nitzulescu, 1931) (Diptera, psychodidae). *Bol Asoc Esp Ent* 1997;**21**:141-6.
33. Martín-Sánchez J, Gramiccia M, Pesson B, Morillas-Márquez F. Genetic polymorphism detected with random amplified polymorphism DNA (RAPD-PCR) in sympatric species of the genus *Phlebotomus*, with special reference to *Phlebotomus perniciosus* and *P. longicuspis* (Diptera, Phlebotomidae). *Parasite* 2000;**7**:247-54.
34. Pesson B, Ready JS, Benabdennbi I, Esseghir S, Martín-Sánchez J, Cadi-Soussi M, et al. Evidence of mitochondrial introgression and cryptic speciation involving *Phlebotomus perniciosus* and *P. longicuspis* from de Moroccan Rif. *Med Vet Entomol* 2004;**18**:25-37.
35. Boussa S, Boumezzough A, Remy PE, Glasser N, Pesson B. Morphological and isoenzymatic differentiation of *Phlebotomus perniciosus* and *P. longicuspis* (Diptera, Psychodidae) in Southern Morocco. *Acta Trop* 2008;**106**:184-9.
36. Depaquit J, Leger N, Killick-Kendrick R. Description de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *riouxi* n. sp. d'Afrique du Nord. *Parasite* 1998;**5**:151-8.

37. Rioux JA, Croset H, Leger N. Présence en Espagne de *Phlebotomus alexandri* Sinton, 1928 (Diptera, Psychodidae). *Ann Parasitol Hum Comp* 1974a;**49**:126-8.
38. Rioux JA, Croset H, Leger N. Présence en Espagne de *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc et Rioux, 1970 (Diptera, Psychodidae). *Ann Parasitol Hum Comp* 1974b;**49**: 505-7.
39. Morillas-Márquez F, Úbeda-Ontiveros JM, Guevara-Benítez DC, González-Castro J. Confirmación de la presencia en España de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi* Croset, Abonnenc y Rioux, 1970 (Diptera, Phlebotomidae). *Rev Iber Parasitol* 1982;**42**:345-6.
40. Martínez-Ortega E. Los flebotomos Ibéricos. I. Almería. *Ann Biol* 1985;**3**:107-11.
41. Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martinez S, Pratlong F, Balard Y, et al. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vect Born Zoonot Dis* 2009;**9**: 687-94.
42. Rioux JA, Akalay O, Périères J, Dereure J, Mahjour J, Le Houerou HN, et al. L'évaluation écoépidémiologique du risque leishmanien au Sahara atlantique marocain. Intérêt heuristique de la relation "Phlébotomes-bioclimats". *Ecol Medit* 1997;**23**:73-92.
43. Rispaill P, Dereure J, Jarry D. Risk zones of human Leishmaniasis in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;**97**:477-83.
44. Rioux JA, Killick-Kendrick R, Périères J, Turner DP, Lanotte G. 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* 1980;**55**:445-53.
45. Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Irigaray C, Martín-Sánchez J. 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* 2011;**138**:1234-44.

46. Reiter P. Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart. *Malaria J* 2008;**7**:S3. <http://www.malariajournal.com/content/pdf/1475-2875-7-S1-S3.pdf> [accessed 5 December 2011].

Artículo 3

Leishmaniosis en la provincia de Cádiz (sur de España): seroprevalencia y factores de riesgo de la leishmaniosis canina e incidencia en humanos

Morales-Yuste M.¹, Acedo-Sánchez C.², Barón S.D.¹, Morillas-Márquez F.¹,
Díaz-Sáez V.¹, Corpas-López V.¹, Martín-Sánchez J.¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Campus de la Cartuja S/N, 18071 Granada.

²Laboratorio de análisis veterinarios ANLAVE. Granada.

Publicado en Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología. Octubre 2011; 70 (2): 138-144

Abstract

We performed a cross-sectional study to know the seroprevalence of canine leishmaniasis (CaL) in the province of Cadiz and to estimate the individual risk factors; we also estimated the incidence of human leishmaniasis by compiling all the reported cases. The diagnosis of CaL was performed using the analysis of the serum by the IFAT technique and considering 160 as the threshold title. To estimate the risk factors we applied a multivariate analysis by logistic regression. 37'6% of the dogs (37/98) had antibody titles ≥ 80 and 31'6% (32/98) ≥ 160 , which represents the seroprevalence of CaL. Besides, 0'08 human leishmaniasis cases per 100,000 inhabitants occur each year in the province of Cadiz. Dogs that live in

landlocked locations have a risk of CaL 10 times higher than those that live in coastal areas. In addition, being a female, sleeping indoors, having medium or long hair and weighing more than 25kg act as factors of protection. To equality of the other factors, dogs with clinical signs compatible with CaL are almost 5 times more likely to have CaL than those that do not show these signs.

Resumen

Realizamos un estudio transversal para conocer las cifras de seroprevalencia de la leishmaniosis canina (LCa) en la provincia de Cádiz y estimar los factores de riesgo individuales; igualmente, estimamos la incidencia de leishmaniosis humana por recopilación de los casos declarados. El diagnóstico de la LCa se ha realizado mediante el análisis del suero por la técnica de IFI usando como umbral el título 160. Para la estimación de los factores de riesgo hemos aplicado un análisis de regresión logística multivariante. El 37'6% de los perros (37/98) tenían título de anticuerpos ≥ 80 y el 31'6% (32/98) ≥ 160 que representa la seroprevalencia de LCa; además cada año se produce en la provincia de Cádiz una media de 0'08 casos de leishmaniosis humana por cada 100.000 habitantes. Los perros que viven en localidades sin costa tienen un riesgo de LCa 10 veces mayor que aquellos que viven en localidades costeras. Por otro lado, el ser hembras, pernoctar en el interior, tener el pelo medio o largo y pesar más de 25kg, actúan como factores de protección. A igualdad de los demás factores, los perros con signos clínicos compatibles con LCa tienen casi 5 veces más probabilidades de LCa que aquellos que no los muestran.

Introducción

El perro es el principal reservorio de la leishmaniosis causada por *Leishmania (L.) infantum*. En España, desde mediados de los años 80, se han realizado un notable número de estudios epidemiológicos sobre este animal que muestran un amplio abanico de prevalencias de Leishmaniosis Canina o LCa, con valores que van desde el 0 al 100%, y ponen de manifiesto el carácter endémico de la leishmaniosis en este país y su distribución parcheada (Acedo-Sánchez et al, 1996; Morillas-Márquez et al, 1996; Fisa et al, 1999; Lepe et al, 2000; Solano-Gallego et al, 2001; Miró et al, 2007; Martín-Sánchez et al, 2009; Gálvez et al,

2010). Para la realización de estos estudios, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1984; WHO, 2010) recomienda la utilización de técnicas serológicas entre las cuales la inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la técnica más utilizada (Morillas-Márquez et al, 1995; Otranto et al, 2004; Ferroglio et al, 2007) y es considerada por algunos como “gold standard” de los métodos serológicos (Maia et al, 2008; Adel et al, 2010).

A pesar de esta abundancia de estudios epidemiológicos a lo largo del territorio español, poco conocemos sobre la situación de la LCa en la provincia de Cádiz, lo que justifica la realización de este trabajo. Nuestros objetivos han sido, 1. Estimar la seroprevalencia de la LCa en esta provincia, 2. Investigar los factores de riesgo individuales y compararlos con los determinados en otras zonas endémicas. 3. Estimar la incidencia de leishmaniosis humana por recopilación de los casos declarados.

Material y métodos

Área de estudio: La provincia de Cádiz está situada en el sur de Andalucía (sur de España), limitando al norte con Sevilla y Huelva, y al este con Málaga. La costa suroeste de la provincia está bañada por el Océano Atlántico y la sureste por el Mar Mediterráneo.

El área de estudio se extiende a lo largo de la franja costera gaditana de influencia atlántica (Figura 61). Desde un punto de vista bioclimático todos los municipios muestreados pertenecen al piso Termomediterráneo, caracterizado por la presencia de terrenos dedicados a los cultivos de regadío y viñedos en su área más septentrional, y salinas en la zona centro-austral. Además, toda la costa se encuentra flanqueada por grandes extensiones de arenales y dunas (Rivas-Martínez et al, 1987). Las localidades muestreadas se encuentran a altitudes comprendidas entre 4 y 201 metros sobre el nivel del mar; 7 localizadas en la costa atlántica (altitud entre 4 y 41 m) y 3 en el interior (altitud entre 21 y 201 m), siendo Jerez de la Frontera el municipio más alejado de la costa (23 Km).



Figura 61. Mapa de la provincia de Cádiz mostrando el área de estudio.

Muestreo transversal: Entre abril de 2008 y marzo de 2009 hemos realizado un estudio transversal para conocer las cifras de sero-prevalencia de la leishmaniosis canina en la provincia de Cádiz. La recogida de sangre se ha realizado con la colaboración de 3 clínicas veterinarias de la provincia. El muestreo se ha realizado de forma aleatoria entre los perros que acudieron a cada clínica. En el momento de la recogida de muestras de cada animal se ha rellenado una ficha epidemiológica en la que se han reflejado datos de interés como edad, sexo, ocupación, presencia de signos clínicos, motivo de consulta, etc. Estos datos se han utilizado posteriormente para la realización de un análisis multivariante.

El diagnóstico de la LCa se ha realizado analizando el suero con la técnica de IFI para lo cual hemos seguido idénticos protocolos a los utilizados en anteriores encuestas realizadas por nuestro grupo (Acedo-Sánchez et al, 1996; Morillas-Márquez et al, 1996; Martín-Sánchez et al, 2009). Brevemente: i. se realizaron diluciones seriadas de los sueros problema para su titulación. ii. como antígeno se empleó la cepa de *L. infantum* MCAN/ES/90/DP204, caracterizada con la técnica de electroforesis de isoenzimas como zimodemo MON-1 (Martín-Sánchez et al, 2004); esta cepa se mantiene en el laboratorio utilizando los medios de cultivo EMTM y RPMI-1640, al igual que crioconservada en N₂ líquido. iii. como umbral hemos considerado el título 160, aunque también se han tenido en cuenta títulos inferiores a éste para determinar el porcentaje de perros con resultado dudoso o para conocer la seropositividad.

Estudio estadístico para investigar los factores de riesgo de la LCa: Hemos considerado perros con LCa aquellos que tienen un título de anticuerpos determinado mediante $IFI \geq 160$. Se construye así una variable binaria que hemos utilizado como variable dependiente o variable respuesta. Como variables independientes utilizamos diferentes características del animal y otras eco-epidemiológicas: sexo, edad, peso, raza (pura, cruce), longitud del pelo (corto, medio/largo), signos clínicos (asintomático, sintomático), aptitud (compañía, caza, otras), hábitat 1 (rural, urbano/periurbano), hábitat 2 (con costa/ sin costa), altitud, lugar donde pernocta (exterior, interior), convivencia con otros animales, convivencia con otros perros y desplazamientos a otras zonas. Todas las variables analizadas son categóricas a excepción de la edad y el peso del animal, y la altitud. Dado que la variable dependiente es categórica, el análisis realizado ha sido una regresión logística. Cuando se ha sospechado, hemos investigado la existencia de interacción y/o confusión entre distintas variables mediante la construcción y comparación de diferentes modelos de regresión logística. Para la construcción del modelo, hemos utilizado el criterio de selección basado en las pruebas de hipótesis que propone seleccionar las variables en función de la significación estadística de su asociación con la enfermedad, siguiendo para ello la estrategia de selección hacia atrás o *backward selection* (Sánchez-Cantalejo Ramírez, 2000). El análisis estadístico se ha realizado con el paquete informático SPSS 15.0 para Windows.

Leishmaniosis humana: Con objeto de recopilar los casos de leishmaniosis humana que se han declarado en la provincia de Cádiz entre 1984 y 2010, y comparar la incidencia con las de otras provincias próximas, hemos realizado una revisión de los Boletines Epidemiológicos Semanales del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto Carlos III de Madrid, los Boletines Epidemiológicos Semanales de la Comunidad Autónoma de Andalucía y el Anuario Estadístico de Andalucía.

Resultados

Animales y sero-prevalencia de LCa: Hemos investigado 98 perros de edades comprendidas entre 1 y 16 años (media 5'4), de los cuales el 57'1% fueron machos. Entre los motivos de la consulta, el 30'6% acudieron para revisión rutinaria, castración o vacunación, mientras que en un 11'2% el motivo era revisión de leishmaniosis.

Un 26'5 % de los animales mostraban signos clínicos compatibles con la leishmaniosis canina. Los títulos de anticuerpos anti-leishmania han variado de 0 (31'6%) a 1.280 (24'5%). La seropositividad ha alcanzado el 68'4%. El 37'6% (37/98) tenían título de anticuerpos ≥ 80 y el 31'6% (32/98) ≥ 160 , representando esta última cifra la seroprevalencia de LCa. El porcentaje de perros con resultado dudoso (títulos de anticuerpos 20, 40 y 80) fue 36'7%.

Asociaciones entre LCa y otros parámetros: En la Tabla 14 se muestran las variables finalmente retenidas como significativas en el modelo multivariante; en éste, el sexo, pelo corto/medio-largo, peso $\leq 25 / > 25$ kg, habitat con costa/ sin costa, pernocta interior/exterior y síntomas se muestran asociados a la variable dependiente LCa (IFI <160 /IFI ≥ 160). A lo largo del proceso de construcción de este modelo, las demás variables han perdido su significación y se han eliminado del mismo de forma secuencial.

Tabla 14. Factores de riesgo de LCa en la provincia de Cádiz: modelo de regresión logística multivariante. Variable dependiente LCa (IFI<160/IFI≥160). Ref. = Categoría de Referencia; I.C. = Intervalo de Confianza. $R^2 = 0'407$.

VARIABLES	N (%)	Odds Ratio (I.C. 95%)	Valor p
Sexo			
Hembra (Ref.)	40 (44%)		
Macho	51 (56%)	3'96 (1'19-13'19)	0'025
Hábitat 2			
Con costa (Ref.)	39 (42'9%)		
Sin costa	52 (57'1%)	10'10 (2'56-39'86)	0'001
Pernocta			
Interior (Ref.)	47 (51'6%)		
Exterior	44 (48'4%)	4'69 (1'30-16'94)	0'019
Signos clínicos			
No (Ref.)	67 (73'6%)		
Si	24 (26'4%)	4'78 (1'35-16'94)	0'015
Pelo			
Medio/Largo (Ref.)	48 (52'7%)		
Corto	43 (47'3%)	4'33 (1'31-14'28)	0'016
Peso			
>25 kg (Ref.)	34 (37'4%)		
≤25 kg	57 (62'6%)	3'75 (1'13-12'48)	0'031

A igualdad de las demás variables incluidas en el modelo, los perros que viven en localidades sin costa tienen un riesgo de LCa 10 veces mayor que aquellos que viven en localidades costeras. Además, el ser hembras, pernoctar en el interior, tener el pelo medio o largo y pesar más de 25kg, actúan como factores de protección. A igualdad de los demás factores, los perros con signos clínicos compatibles con LCa tienen casi 5 veces más probabilidades de LCa que aquellos que no los muestran.

Resultados

Leishmaniosis humana: En la provincia de Cádiz, el primer caso de leishmaniosis humana se declaró en 1990, acumulando hasta 2010 un total de 24; ésto proporciona una tasa anual de incidencia (número casos/100000 habitantes) de 0'08. En la provincia de Huelva los datos son similares (primer caso en 1990 e incidencia 0'09), mientras que en Sevilla y Málaga las tasas son superiores (0'17 y 0'39, respectivamente) con casos declarados desde 1984 (Figura 62).

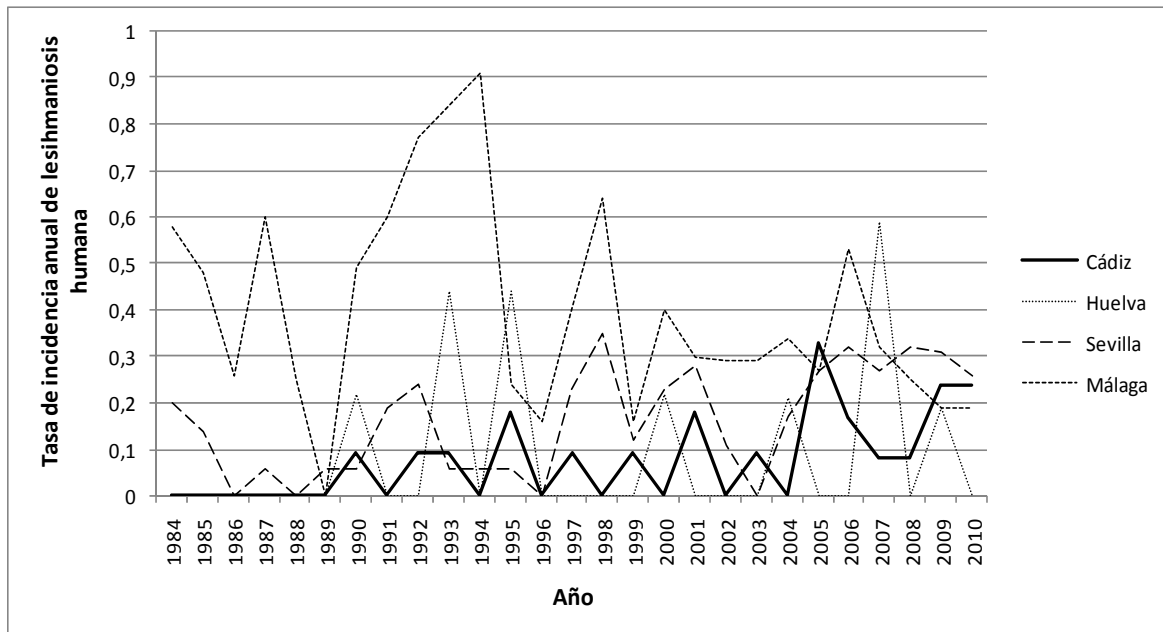


Figura 62. Evolución de la incidencia anual de leishmaniosis humana registrada en Cádiz y en las provincias limítrofes de Huelva, Sevilla y Málaga entre los años 1984-2010. Tasa = nº casos/ 100.000 habitantes y año.

Discusión

La seroprevalencia de LCa en la provincia de Cádiz supera el 30%, una cifra mucho más elevada que el 7% encontrado tanto en la vecina provincia de Huelva (Lepe et al, 2000) como en zonas próximas como el Algarbe, en el sur de Portugal (citado por Maia et al, 2009). La utilización de las clínicas veterinarias como método para muestrear los perros tiene sin duda el efecto de sobreestimar esta prevalencia, como indica el hecho que se están analizando un mayor porcentaje de perros con signos clínicos. Así, en un estudio de la seroprevalencia de la LCa realizado en la provincia de Granada, en el que los perros se

muestrearon mediante concentración para la vacunación anti-rábica o el microchipado canino, el porcentaje de perros con signos clínicos fue 6'3% (Martín-Sánchez et al, 2009) frente al 26'5% del presente estudio. El alto porcentaje de perros con serología dudosa detectado es normal en este tipo de estudios pudiendo deberse a la existencia de un periodo de infección pre-patente, a fases de remisión de la misma, a la aparición de reacciones cruzadas inespecíficas o a formas latentes de la enfermedad.

La incidencia de leishmaniosis humana estimada a partir de los casos declarados indica que cada año se produce en la provincia de Cádiz una media de 0'08 casos por cada 100000 habitantes. Estas cifras hacen referencia fundamentalmente a los casos viscerales mientras que los cutáneos no suelen declararse; tampoco tenemos conocimiento de los casos de infección críptica. Como se ha indicado en anteriores ocasiones, los datos presentados en los Boletines Epidemiológicos no son más que el pico del iceberg, siendo los casos reales de infección por *Leishmania* netamente superiores a los declarados en estas publicaciones (Morillas-Márquez et al, 2010).

Con respecto a la detección de riesgos individuales, este estudio nos ha permitido observar que en la provincia de Cádiz, la LCa está asociada a características propias del animal como son el sexo, la longitud del pelo y su peso. El mayor riesgo de LCa que experimentan los machos con respecto a las hembras ha sido puesto de manifiesto por otros autores como Martínez-Cruz et al, (1990) y Fisa et al, (1999) en focos de Córdoba y Cataluña, respectivamente. Por el contrario, el sexo no estaba asociado a la LCa en los estudios realizados por Acedo-Sánchez et al, (1996) y Martín-Sánchez et al, (2009) en la Alpujarra granadina, o Morillas-Márquez et al, (1996) en la Axarquía malagueña. Con la longitud del pelo ocurre igual, de forma que para algunos autores hay asociación (Morillas-Márquez et al, 1996; Moreira et al, 2003) mientras que otros no la encuentran (Fisa et al, 1999; Martín-Sánchez et al, 2009). Parece lógico pensar que los perros con pelo medio/largo deben estar más protegidos de la picadura de los flebotomos que aquellos con pelo corto; en nuestro estudio el riesgo de LCa de éstos últimos, a igualdad de las demás variables, es 4'3 veces mayor que en los de pelo medio/largo. Martín-Sánchez et al, (2009) ponían de manifiesto en Las Alpujarras que la seroprevalencia de la LCa se incrementaba gradualmente con el

Resultados

peso del animal, interpretándolo como el resultado de la mayor atracción por el vector que podían ejercer los perros con mayor volumen corporal; similares resultados encuentran Alonso et al, (2010) en la provincia de Murcia y Gálvez et al, (2010) en la de Madrid. En el presente estudio sucede todo lo contrario y son los perros de $\leq 25\text{kg}$ los que están más expuestos a sufrir LCa.

Sorprendentemente, no hemos encontrado asociación entre la edad del animal y la LCa, lo que sería un resultado lógico en una zona endémica (Acedo-Sánchez et al, 1996; Fisa et al, 1999; Moreira et al, 2003; Martín-Sánchez et al, 2009; Alonso et al, 2010; Gálvez et al, 2010): a mayor edad, mayor tiempo de exposición a los flebotomos y por tanto, mayor la probabilidad de ser picado por una hembra infectada.

Aunque las características clínicas de la LCa no son patognómicas, es evidente que LCa es más frecuente entre perros con signos clínicos que entre aquellos que no los tienen, casi 5 veces mayor en nuestro estudio.

Hay más acuerdo entre los diferentes autores en considerar que dormir fuera de la casa es un importante factor de riesgo de LCa (Acedo-Sánchez et al, 1996; Zaffaroni et al, 1999; Martín-Sánchez et al, 2009; Gálvez et al, 2010). El mayor riesgo de LCa que presentan los perros que duermen fuera de casa con respecto a los que lo hacen dentro puede deberse al carácter exófilo de los vectores *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi*.

Por último, a igualdad de las demás variables incluidas en el modelo, los perros que viven en poblaciones que, aunque próximas a la costa ($< 23\text{ km}$), no tienen playa, poseen un riesgo de LCa diez veces mayor que aquellos que viven en localidades de costa en las que, como decíamos anteriormente, abundan las extensiones de arenales y dunas. Aunque no hemos realizado un estudio cuantitativo sobre los flebotomos de la zona, podemos interpretar que esto se debe probablemente a diferencias en la densidad de flebotomos en ambas zonas, más favorecidos por las características ecológicas de las zonas sin costa. La influencia de la densidad de flebotomos sobre la LCa, concretamente del principal vector de *L. infantum* en España, *P. perniciosus*, ha sido indicada por Martín-Sánchez et al, (2009) y por Rioux et al, (1977) en Francia.

Conclusiones

Podemos considerar que en la provincia de Cádiz la leishmaniosis cursa de forma endémica, tanto en su variante visceral humana como canina. Los perros machos, de pelo corto y peso ≤ 25 kg que duermen fuera de la casa, situada en un pueblo no costero son los que tienen mayor riesgo de LCa, concretamente un riesgo 3036 veces mayor que los perros hembra, de pelo medio/largo y peso >25 kg que duermen dentro de la casa, situada en un pueblo con costa. Si además esos perros tienen signos clínicos compatibles con LCa, el riesgo es 14501 veces mayor. Aunque entre los diversos estudios existen diferencias en la metodología aplicada para determinar los factores de riesgo, especialmente la realización exclusiva de análisis univariantes, o más acertada de multivariantes (Martín-Sánchez et al, 2009; Alonso et al, 2010; Gálvez et al, 2010), lo cierto es que cada foco de LCa parece tener sus propias características, de forma que el modelo construido para un foco no parece servir para describir los factores asociados a la LCa en otro foco. Todo ello pone de manifiesto la complejidad para dilucidar las variables predictoras de esta enfermedad de carácter vectorial.

Agradecimientos

Agradecemos a las clínicas veterinarias “La Dehesilla” de Sanlúcar de Barrameda (D. Jesús Sumariva-Clavijo) y “Avila Fornell S.L.” del Puerto de Santa María y Chiclana de la Frontera (D. Fernando Sanz-Herrera y D. Francisco Lira-Naranjo) su inestimable colaboración en la obtención de las muestras.

A la Junta de Andalucía por el proyecto PO7-CVI-03249, y al Ministerio de Ciencia e Innovación por el proyecto CGL2007-66943-CO2/BOS.

Bibliografía

1. ACEDO-SÁNCHEZ C, MARTÍN-SÁNCHEZ J, VÉLEZ-BERNAL ID, SANCHÍS-MARÍN MC, LOUASSINI M, MALDONADO JA, MORILLAS-MÁRQUEZ F. 1996. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). *Int J Parasitol* 25: 303-10.

2. ADEL A, SAEGERMAN C, SPEYBROECK N, PRAET N, VICTOR B, DE DEKEN R, SOUKEHAL A, BERKVENNS D. 2010. Canine leishmaniasis in Algeria: True prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Vet Parasitol* 172: 204-213.
3. ALONSO F, GIMÉNEZ-FONT P, MANCHÓN M, RUIZ DE YBÁÑEZ R, SEGOVIA M, BERRIATUA E. 2010. Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean area. *Zoon Pub Health* 57: 318-28.
4. Anuario Estadístico de Andalucía. 1984-2005. Consejería de Economía, Innovación y Ciencia. Instituto de Estadística de Andalucía. Sevilla. Disponible en: URL: www.juntadeandalucia.es
5. Boletín Epidemiológico Semanal de la Comunidad Autónoma de Andalucía. 1984-2005. Junta de Andalucía. Consejería de Salud. Dirección General de Ordenación Sanitaria. Sevilla.
6. Boletín Epidemiológico Semanal del Instituto de Salud Carlos III. 1982-2005. Centro Nacional de Epidemiología. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. Disponible en: URL: www.isciii.es
7. FERROGLIO E, CENTARO E, MIGNONE W, TRISCIUOGLIO A. 2007. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol* 144: 162-166.
8. FISA R, GÁLLEGO M, CASTILLEJO S, AISA MJ, SERRA T, RIERA C, CARRIÓ J, GÁLLEGO J, PORTÚS M. 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83: 87-97.
9. GÁLVEZ R, MIRÓ G, DESCALZO MA, NIETO J, DADO D, MARTÍN O, CUBERO E, MOLINA R. 2010. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 169: 327-334.
10. LEPE JA, UBEDA JM, MORILLAS F, GUEVARA DC, MARTÍN-SÁNCHEZ J, GUERRERO FJ, SANCHÍS-MARÍN MC, 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: 113-119.
11. MAIA C, CAMPINO L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158: 274-287.
 12. MAIA C, AFONSO MO, NETO L, DIONÍSIO L, CAMPINO L. 2009. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *J Vector Borne Dis* 46: 268-272.
 13. 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.
 14. MARTÍN-SÁNCHEZ J, MORALES-YUSTE M, ACEDO-SÁNCHEZ C, BARÓN SD, DÍAZ V, MORILLAS-MÁRQUEZ F. 2009. Canine Leishmaniasis in Southeastern Spain. *Emerg Infect Dis* 15: 795-798.
 15. MARTÍNEZ-CRUZ S, MARTÍNEZ-MORENO A, MARTÍNEZ-MORENO FJ, MARTÍNEZ-GÓMEZ F, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ S. 1990. Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba. *Rev Iber Parasitol* 50: 1-7.
 16. MIRÓ G, MONTOYA A, MATEO M, ALONSO A, GARCÍA S, GARCÍA A, CABALLERO MJ, MOLINA R. 2007. A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the región of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res* 101: 253-57.
 17. MOREIRA ED, DE SOUZA VMM, SREENIVASAN M, LOPES NL, BARRETO RB, DE CARVALHO LP. 2003. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 69: 393-97.
 18. MORILLAS-MÁRQUEZ F, MARTÍN-SÁNCHEZ J, ACEDO C, SANCHÍS-MARÍN MC. 1995. Importancia actual de las leishmaniosis en España. *Ars Pharm* 36: 19-40.
 19. MORILLAS-MÁRQUEZ F, SÁNCHEZ-RABASCO F, OCAÑA J, MARTÍN-SÁNCHEZ J, OCAÑA-WIHELMI J, ACEDO C, SANCHÍS-MARÍN MC. 1996. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog and vector. *Parasitol Res* 82: 569-570.

20. MORILLAS-MÁRQUEZ F, BARÓN SD, MORALES-YUSTE M, DÍAZ-SÁEZ V, MARTÍN-SÁNCHEZ J. 2010. Situación de la leishmaniosis en Granada después de 25 años de estudio. *Ars Pharm* 51 (vol. 3), en prensa.
21. OMS. 1984. "La leishmaniosis". Serie de Informes Técnicos. N° 793. Ginebra.
22. OTRANTO D, PARADIES P, SASANELLI M, BRANDONISIO O. 2004. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 42: 2769-2770.
23. RIOUX JA, CROSET H, LANOTTE G. 1977. Écologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation. *Colloq Int Cent Nat Recti Set* 39 : 295-305.
24. RIVAS-MARTINEZ S, BANDULLO JM, SERRADA R, ALLUE-ANDRADE JL, MONERO DEL BURGO JL, GONZALEZ-REBOLLAR JL. 1987. Memoria del mapa de series de vegetación de España. Serie Técnica. España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. I.C.O.N.A.
25. SÁNCHEZ-CANTALEJO RAMÍREZ E. 2000. Regresión logística en salud pública. Junta de Andalucía. Granada. Escuela andaluza de salud pública.
26. SOLANO-GALLEGO L, RIERA C, ROURA X, INIESTA L, GALLEGU M, VALLADARES JE, FISA R, CASTILLEJO S, ALBEROLA J, FERRER L, ARBOIX M, PORTÚS M. 2001. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 96: 265-276.
27. WHO. 2010. "Control of the leishmaniases". Technical Report Series. N° 949. Geneva.
28. ZAFFARONI E, RUBAUDO L, LANFRANCHI P, MIGNONE W. 1999. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitol* 81: 11-9.

Artículo 4

Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios

Manuel Morales-Yuste¹, Francisco Morillas-Márquez¹, Victoriano Díaz-Sáez¹, Sergio Barón-López¹, Carmen Acedo-Sánchez², Joaquina Martín-Sánchez¹

¹Departament of Parasitology. Faculty of Pharmacy. University of Granada (Spain)

²Veterinarian laboratory analysis ANLAVE. Granada.

Publicado en Parasitology Research. Enero 2012. DOI 10.1007/s00436-011-2812-7

Abstract

Our aim was to establish the influence on the prevalence of canine leishmaniasis (CanL) of the following: i) the use of different diagnostic techniques, ii) different positivity thresholds, iii) selection of animals either at random from a population or focused on symptomatic individuals, iv) the function which the dog performs v) scenarios with differing epidemiological characteristic. Three groups of dogs were analyzed (416 sampled at random from an endemic area, 71 with symptomatology compatible with CanL and 15 from a non-endemic area) using three serological techniques (indirect fluorescence antibody test (IFAT), Kalazar DetectTM and Q Letitest ELISA) and a PCR-ELISA. The diagnostic technique had a considerable influence on the CanL prevalence value obtained. Uncertain antibody titres were more representative in dogs sampled at random and with the IFAT

technique. Although employing different capture antigens, correlation of results was higher between the two commercial techniques in the group of dogs with symptomatology compatible with CanL. The sensitivity and specificity values of the different diagnostic techniques were affected by the epidemiological characteristic of the area under study, the presence of clinical signs and the function which the dog performs. This must be taken into account when comparing endemicity in different geographical areas, such as in studies carried out for the construction of risk maps. Using more than one technique, and adopting the criterion of considering an animal to be positive only when it has been diagnosed as such by more than one technique, considerably raises the prevalence values but maintains the differences between areas with different characteristics.

Introduction

Cases of canine leishmaniasis (CanL) have been reported in 50 of the 88 countries where human leishmaniasis is endemic, and the Mediterranean Basin is one the most affected areas (Alvar et al. 2004). In zoonosis caused by *Leishmania (L.) infantum*, the dog acts as the main reservoir for the disease. In Spain, since the mid-1980s, a considerable number of epidemiological studies have been carried out on dogs which reveal a wide array of CanL prevalence values ranging from 0 to 100%, highlighting the endemic nature of leishmaniasis in this country and its patchy distribution (Acedo-Sánchez et al. 1996; Fisa et al. 1999; Gálvez et al. 2010; Lepe et al. 2000; Martín-Sánchez et al. 2009; Miró et al. 2007; Morillas et al. 1996; Solano-Gallego et al. 2001). There have been repeated calls for the creation of a distribution map for CanL prevalence in Spain, whilst authors also acknowledge the difficulties involved due to the heterogeneous characteristics of the studies carried out in order to determine this prevalence. Factors such as sample size and selection method (random or focused on a determined group such as, for example, dogs with or without clinical symptoms), time of year and diagnostic technique have an enormous influence on the results obtained and make comparison difficult. Serological tests present the added complication of being able to use different positivity thresholds for the same diagnostic technique (Acedo-Sánchez et al. 1996; Lepe et al. 2000; Miró et al. 2007).

Most epidemiological studies on CanL have been carried out using serological techniques, recommended by the World Health Organization due to their greater ease of use and efficiency (WHO, 2010). However it widely acknowledged that these immunological methods are limited by their inability to distinguish between past and present infections, as well as by the possibility of cross-reactions with other infectious agents (Alvar et al. 2004; Iniesta et al. 2002; Porrozzi et al. 2007; Srividya et al. 2009). Indirect fluorescence antibody test (IFAT) is one of the most frequently used (Ferroglio et al. 2007; Morillas-Márquez et al. 1995; Otranto et al. 2004); considered by some (Adel et al. 2010; Maia et al. 2008) to be the 'gold standard' of serological methods and established as the WHO reference technique since the 1980s (WHO, 1984), a criterion which has been maintained to the present day (WHO, 2010). For these reasons, and given that it is also used extensively for the routine diagnosis of clinical cases in the veterinary field (Fernández-Pérez et al. 1999), it was selected as the serological reference technique in this study.

Furthermore, when quantitative serological methods are used in epidemiological surveys, a significant number of animals display titres below the positivity threshold, known as uncertain titres, which could be due to periods of pre-patent infection, to remission stages of the latter, to the appearance of non-specific cross-reactions or to latent forms of the disease (Acedo-Sánchez et al. 1996; Ferroglio et al. 2007; Martín-Sánchez et al. 2001). Within this context, a whole series of proteins specific to *Leishmania*, most of them conserved in evolutionary terms, were characterized for diagnostic purposes. One of these is the chimeric protein "Q" which contains antigenic determinants of the antigens LiP2a, LiP2b, LiP0 and LiH2A (Soto et al. 1998), and the recombinant protein K39 (rK39), with a repeat sequence which is highly conserved among members of the *L. donovani* complex (Chappuis et al. 2006; Mohebbali et al. 2004). Use of this protein is becoming increasingly common in the diagnosis of CanL. These and other antigens have been compiled by Srividya et al. (2001) in a review in which the authors discuss the major technological advances over the last 10 years in the diagnosis of visceral leishmaniasis. Moreover, ever since the introduction of PCR as a diagnostic method, considerably higher infection prevalence values have been recorded than those obtained through serological or parasitological methods,

due to the greater sensitivity of this technique (Baneth et al. 2008; Iniesta et al. 2002; Maia and Campino 2008; Otranto et al. 2009; Ozerdem et al. 2009; Rodríguez-Cortés et al. 2007).

Based on these premises, our objective was to confirm the influence on CanL prevalence of: i) the use of different diagnostic techniques, ii) different positivity thresholds, iii) selection of animals either at random from a population or focused on symptomatic individuals, iv) the function which the dog performs v) scenarios with different epidemiological characteristics, represented in this case by two areas with different bioclimatic characteristics.

Materials and methods

Dogs and samples

Three groups of dogs were established. Group 1 or dogs sampled at random (DSR) consists of 416 animals sampled at random in southeastern areas of Spain proven to be endemic for CanL (Acedo-Sánchez et al. 1996; Martín-Sánchez et al. 2009). The cross-sectional survey was performed in 2006 and 2007 to coincide with rabies vaccination and dog microchipping campaigns, and covers 2 bioclimatic levels (Thermomediterranean and Mesomediterranean) with different CanL prevalence. Group 2 or dogs with symptomatology compatible with canine leishmaniasis (DSCCanL) is made up of 71 animals with clinical symptoms compatible with CanL, sourced through various veterinary clinics in the city of Granada and its metropolitan area. The third group or dogs from a non-endemic area (DNEA) comprises 15 healthy animals from Strasbourg (northern France) - a non-endemic area for CanL – which had never travelled to an endemic area, also sourced via veterinary clinics.

All the animals were given a physical examination to determine the existence or lack of clinical signs compatible with CanL. Blood was extracted from the cephalic vein and divided into two portions, one for serum separation through centrifugation and the other for the addition of EDTA as an anticoagulant. The samples were stored at -20°C until use. Whole blood for molecular diagnosis was not available for the DSCCanL group.

Diagnostic techniques

For the diagnosis of CanL, we used three serological techniques and one molecular technique, applied independently as blind tests.

Indirect fluorescence antibody test The titre threshold selected as the gold standard to establish the seroprevalence of CanL was 160, in accordance with previous studies carried out in this area (Acedo-Sánchez et al. 1996; Martín-Sánchez et al. 2009; Morillas et al. 1996). Serial dilutions were made of problem serums for titration purposes. The *L. infantum* strain MCAN/ES/90/DP204, characterized via the isoenzyme electrophoresis technique as zymodeme MON-1 (Martín-Sánchez et al. 2004), was used as an antigen at a concentration of 2×10^6 promastigotes/ mL. Rabbit anti-gamma globulin (I.C.N. Biomedicals) was used as a conjugate at a concentration of 1/100 in Evans blue previously diluted at $1/10^4$ with Phosphate buffered saline.

Kalazar Detect™ (KD) Canine Rapid Test (InBios International, Inc., USA) Commercial immunochromatographic method based on the detection of anti-leishmania antibodies through the use of test strips impregnated with protein rK39 as the antigen and a complex made up of protein A and colloidal gold as a conjugate. This test is considered positive when the control and problem lines change to red. We used 20 µL of undiluted problem serum, the test strip itself and 100-150 µL of loading buffer, as per the manufacturer's instructions. The results were read 10 minutes after the reaction started.

Q Letitest ELISA (QLE) Leishmania (Laboratorios Leti SA. Spain) CanL diagnosis kit based on the ELISA technique, in which the wells of the microtitration plate are coated with recombinant protein Q. Just as with the previous technique, the manufacturing laboratory's instructions were adhered to both in terms of preparing the reagents and in the procedure to be followed. This method only requires 5 µL of problem serum (at a dilution of 1:21). The results were read on the spectrophotometer at a wave length of 450 nm and were interpreted according to the guidelines provided by the manufacturer.

Specific PCR-ELISA technique for L. infantum Genomic DNA was obtained from 200 µL of blood using the DNA Extraction Kit SSS by REAL, Durviz s.l.u. This

Resultados

DNA was hydrated in 20 μL of sterile water via incubation at 65°C for 1 hour, shaking at regular intervals to favour the suspension of the DNA. In each extraction process a control was performed, consisting of an empty tube (extraction control) in order to monitor the appearance of false positives due to contamination of one sample with another. All the extracts obtained were kept at -20°C until their amplification by PCR.

DNA amplification was carried out following the protocol described by Martín-Sánchez et al. (2001). The primers 9 (forward): 5'-CAAAGTCCCCACCAATCCC-3' and 83 (reverse): 5'-AAACCCTGGTCTGGAGGCTTAG-3' were used to amplify a fragment of 75 bp belonging to the *L. infantum* kDNA minicircle region. The following reagents were used: 2.5 μL of buffer 10x (KCl 50 mM and Tris-HCl 10 mM), 2.5 μL of labelling mix (dNTPs, containing dUTP labelled with digoxigenin), 0.5 μL of each of the aforementioned primers at a concentration of 25 pmol/ μL , 0.5 μL of Taq polymerase (0.6 U) (PCR-ELISA DIG Labelling. Roche Diagnostics GmbH. Mannheim, Germany). Each of the samples was amplified in triplicate, adding 1, 1 and 2 μL of DNA in a final volume of 25 μL . The reaction was performed in a Techne thermal cycler (Progene) with the following temperature profile: 94°C for 3 min to denature the DNA and 40 cycles of $94^\circ\text{C}/30\text{ s}$, $60^\circ\text{C}/30\text{ s}$, $72^\circ\text{C}/30\text{ s}$ and, to finish, 1 cycle of 72°C for 2 min.

Detection of the amplified samples was performed with the PCR-ELISA kit DIG Detection (Roche Diagnostics GmbH. Mannheim, Germany) following the manufacturer's instructions. Hybridization was performed in the Streptavidin-coated microtitration plate at 50°C with gentle agitation for 1 h, with the specific *L. infantum* oligonucleotide probe 5'-CCA AAC AGG GCA AAA ACC-3' ($T_m = 53,7^\circ\text{C}$ and %G+C = 50) labelled at the 5' end with biotin. For detection by ELISA, incubation at 37°C was performed for 30 min with anti-digoxigenin antibody horseradish peroxidase conjugate. This enzyme is involved in the final reaction using 2,2'-azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid] as substrate, and after 30 min with gentle agitation at 37°C in absence of light, absorbency was measured at 405 nm. Each series of washes consisted of three washes of 5 min of incubation. The samples which displayed optical density values ≥ 1 were

considered positive. When optical density was ≥ 0.5 and <1 , we proceeded to repeat the amplification using 2, 3 and 4 μL of DNA.

Data analysis

The statistical treatment of data was performed using the software package SPSS 15.0 for Windows. Concordance between techniques was determined with the Kappa coefficient (κ), interpreted in accordance with Landis and Koch (1977): almost perfect (1.00-0.81), substantial (0.80-0.61), moderate (0.40-0.21), fair (0.40-0.21) and slight (0.20-0.0).

The sensitivity, specificity and efficiency of the different techniques in the dog groups were calculated with the following formulas (Porrozzi et al., 2007):

Sensitivity= [no. true positives/ no. true positives + no. false negatives] x 100

Specificity= [no. true negatives/ no. true negatives + no. false positives] x 100

Efficiency= [no. true negatives + no. true positives/ no. true negatives + no. false negatives + no. false positives + no. true positives] x 100

For the purposes of statistical analysis and calculation of the sensitivity, specificity and efficiency, the results of the techniques with uncertain titres were resized so that there were only two categories. This change was performed by including the animals with uncertain titres (20, 40 and 80) within those considered to be negative for the IFAT technique and including uncertain dogs (class 1) within the negatives (class 0) for QLE. Logistic regression was applied to reveal and quantify any possible association between the result of a technique and other variables. The significance level was set at 5%.

Results and discussion

General data

Table 15 shows the prevalence values obtained for the three groups of animals, distinguishing between bioclimatic level in the group which was sampled at random (DRS). Table 16 shows concordance between the diagnostic techniques used on animals from the DSR group, differentiating between dogs

with and without clinical symptomatology; the function which animals performs and scenarios of differing prevalence represented by the two bioclimatic levels. Table 17 displays the sensitivity, specificity and efficiency values for the serological techniques, taking PCR-ELISA as the reference.

We found that the diagnostic technique used considerably influenced the prevalence value of CanL obtained in the two dog groups, DSR and DSCCanL, although as is to be expected, the greatest differences were observed in the dog group which was sampled at random (Table 15). In the dog group from a non-endemic area (DNEA), the prevalence given for all the techniques is 0%. However, lowering the threshold titre in the IFAT technique from 160 to 80 produced a prevalence of 6.7%, due to the fact that 1 of the 15 dogs studied displayed an anti-leishmania antibody titre of 80. None of the dogs included in this group had visited an endemic CanL area, so this was assumed to be a case of cross-reaction, which was eliminated when we raised the positivity threshold. Nevertheless, although the PCR-ELISA gave a negative result for this same sample, we should not rule out the possibility of autochthonous CanL cases arising in more northerly areas, just as has been recorded in other regions (Díaz-Espiñeira and Slappendel 1997).

Prevalence values by bioclimatic level and /or technique used

In the dog group sampled at random, or DSR, the highest prevalence values, both in general terms and according to bioclimatic level, are produced by the PCR technique (Table 15), which is in keeping with the greater sensitivity of this technique; a factor which has been highlighted by various authors (Baneth et al. 2008; Iniesta et al. 2002; Otranto et al. 2009; Ozerdem et al. 2009; Rodríguez-Cortés et al. 2007). Conversely, the lowest prevalence rates are provided by the KD technique, whilst QLE produces values in between those obtained with IFAT using thresholds of 160 and 80. Of these dogs, 9.2% test positive to two or more serological techniques; of these, 60.6% are PCR positive. Test positive to one of the serological techniques was 37.9%, of which 54.5% are PCR positive.

The greatest discrepancies between the results obtained with PCR and the serological techniques are revealed at the Thermomediterranean bioclimatic level, with 47.2% positive with the molecular technique and 32.0% of dogs positive for

one of the immunological techniques, of which 7.6% were detected by two or more serologies (as opposed to 12.2% in the Mesomediterranean). When the IFAT threshold drops to 80 this seroprevalence value rises to 42.2%, and only 11.3% is detected simultaneously by two of the techniques (15.8% in the Mesomediterranean).

Table 15. Prevalence values obtained with each diagnostic technique in the three groups of animals analyzed: dogs sampled at random or DSR, dogs with symptomatology compatible with canine leishmaniasis or DSCCanL and dogs from a non-endemic area or DNEA.

Dog group	PCR	IFAT (≥160)	IFAT (≥80)	Q Letitest ELISA	Kalazar Detect™
DSR	49.9%(168/337)	16.1%(67/416)	30.0%(125/416)	25.8%(107/415)	7.2%(30/414)
Thermomediterranean	47.2%(101/214)	14.1%(39/277)	28.9%(80/277)	19.2%(53/276)	8.4%(23/275)
Mesomediterranean	54.5% (67/123)	20.1%(28/139)	32.4%(45/139)	38.8% (54/139)	5.0% (7/139)
DSCCanL	NP	77.5%(55/71)	83.1%(59/71)	49.3% (35/71)	56.3% (40/71)
DNEA	0%(0/15)	0%(0/15)	6.7% (1/15)	0% (0/15)	0% (0/15)

In DSR we distinguish between the two bioclimatic levels studied, Thermomediterranean and Mesomediterranean. With the IFAT, the results are expressed according to the thresholds, 80 and 160.

NP Not performed

If we had established the criterion that animals were considered positive if they were diagnosed as such by more than one technique, regardless of whether it was two serological techniques or one serological plus the molecular one, the overall prevalence would be 27.1%: 23.0% in the Thermomediterranean and 34.1% in the Mesomediterranean. These figures climb respectively to 34.5%, 31.0% and 40.7% when the IFAT threshold is 80. These results show higher prevalence values that those produced using only the IFAT technique as the diagnostic method (Martín-Sánchez et al. 2009) but the proportion of the figures between the two bioclimatic levels remains the same. According to Srividya et al. (2011), the combination of serological and molecular methods should provide more reliable data, since in areas of high endemicity PCR is more informative for detection of recent infections in healthy subjects while serological tests would be the best choice to screen for less recent infections.

Symptomatology and Function performed

Six percent (25/416) of the dogs sampled at random displayed symptoms compatible with CanL (5.4% (15/277) in the Thermomediterranean and 7.2%

Resultados

(10/139) in the Mesomediterranean). We were able to establish that a positive result from IFAT or QLE was three to four times likelier in symptomatic than in asymptomatic dogs; on the other hand, the results of the PCR were not associated with symptomatology ($p=0.8$). The results of KD were not related to symptomatology either ($p=0.9$), a factor which works against it being considered a diagnostic test for the active disease (Otranto et al. 2004; Porrozzi et al. 2007). When we establish as a criterion of positivity that at least two techniques must be positive, again positivity is more frequent in the symptomatic group, 2.6 times ($p=0.03$) greater when molecular techniques are included and 4.5 times greater ($p=0.002$) when taking only serological techniques into consideration. These results coincide with those obtained from the DSCCanL group.

Recently, Adel et al. (2010), found differences in the sensitivity and specificity of various serological techniques depending on the function performed by the dogs. In our study, 64.4% (268/416) of the DSR are domestic pets, 8.4% (35/416) guard dogs and the rest belong to a miscellaneous variety of different activities. A positive result in two techniques for the same animal is 3.6 times likelier in guard dogs than in dogs kept as pets (CI 95%: 1.6-7.9), whilst if the techniques involved are purely serological it is 4.8 times more frequent (CI 95%: 2.0-11.7).

Table 16. Concordance between the different diagnostic techniques used on animals from the group sampled at random or DSR.

No. of positive tests	Diagnostic test		Number of samples in each group															
	IFAT160	QLetitest ELISA	KalazarDetect™		PCR-ELISA	All dogs			Asymptomatic dogs			Symptomatic dogs			Function performed			
			ELISA	KalazarDetect™		Thermo	Meso	Total	Thermo	Meso	Total	Thermo	Meso	Total	Pet	Guard	Oth	Total
0	-	-	-	-	-	74	29	103	70	29	99	4	0	4	72	6	25	103
1	+	-	-	-	-	7	3	10	7	3	10	0	0	0	2	4	4	10
	-	+	-	-	-	18	17	35	16	14	30	2	3	5	26	1	8	35
	-	-	+	-	-	7	0	7	7	0	7	0	0	0	7	0	0	7
	-	-	-	+	+	58	32	90	57	31	88	1	1	2	53	4	33	90
2	+	+	-	-	-	5	3	8	5	2	7	0	1	1	5	1	2	8
	-	+	+	-	-	0	2	2	0	2	2	0	0	0	1	1	0	2
	-	-	+	+	+	3	0	3	3	0	3	0	0	0	3	0	0	3
	+	-	-	+	+	12	8	20	11	7	18	1	1	2	4	5	11	20
	-	+	-	+	+	16	19	35	14	19	33	2	0	2	20	2	13	35
	+	-	+	-	-	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
3	+	+	+	-	-	0	2	2	0	2	2	0	0	0	0	0	2	2
	-	+	+	+	+	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
	+	-	+	+	+	3	1	4	3	1	4	0	0	0	0	3	1	4
	+	+	-	+	+	3	6	9	2	3	5	1	3	4	3	1	5	9
4	+	+	+	+	+	5	1	6	4	1	5	1	0	1	4	1	1	6
Total						213	123	336	201	114	315	12	9	21	202	29	105	336

Results are shown for the 336 animals we were able to test with all three serological techniques and the PCR-ELISA, grouped according to bioclimatic level, clinical characteristics and functional type.

Thermo Thermomediterranean, *Meso* Mesomediterranean, *Pet* Pet dogs, *Guard* Guard dogs, *Oth* Other dogs

Resultados

Table 17. Sensitivity, specificity and efficiency values for each of the serological techniques used as compared to the PCR-ELISA, grouped according to bioclimatic levels, symptomatology and function performed of the animals belonging to the group of dogs sampled at random or DSR.

Group	Category	Technique	Sensitivity	Specificity	Efficiency
General data		QL	30.2% (51/169)	72.0% (121/168)	51.0% (172/337)
		KD	8.3% (14/169)	92.9% (156/168)	50.4% (170/337)
		IFAT160	23.7% (40/169)	87.6% (148/169)	55.6% (188/338)
Bioclimatic level	Thermomediterranean	IFAT80	38.5% (65/169)	75.1% (127/169)	56.8% (192/338)
		QL	24.5% (25/102)	79.5% (89/112)	53.3% (114/214)
		KD	11.8% (12/102)	92.9% (104/112)	54.2% (116/214)
Mesomediterranean	IFAT160	IFAT80	23.5% (24/102)	88.5% (100/113)	57.7% (124/215)
		QL	39.2% (40/102)	76.1% (86/113)	58.6% (126/215)
		KD	38.8% (26/67)	57.1% (32/56)	47.1% (58/123)
Symptomatology	Symptomatic	IFAT160	3.0% (2/67)	92.9% (52/56)	43.9% (54/123)
		IFAT80	23.9% (16/67)	85.7% (48/56)	52.0% (64/123)
		QL	37.3% (25/67)	73.2% (41/56)	53.7% (66/123)
Asymptomatic	Pet dogs	QL	63.6% (7/11)	40.0% (4/10)	52.4% (11/21)
		KD	9.1% (1/11)	100.0% (10/10)	52.4% (11/21)
		IFAT160	63.6% (7/11)	90.0% (9/10)	76.2% (16/21)
Function performed	Guard dogs	IFAT80	72.7% (8/11)	60.0% (6/10)	66.7% (14/21)
		QL	28.0% (44/157)	74.0% (117/158)	51.1% (161/315)
		KD	8.3% (13/157)	92.4% (146/158)	50.0% (159/315)
Other dogs	IFAT160	IFAT80	20.4% (32/157)	87.4% (139/159)	54.1% (171/316)
		QL	35.7% (56/157)	76.1% (121/159)	56.0% (177/316)
		KD	31.8% (28/88)	71.9% (82/114)	54.5% (110/202)
QL Q Letitest ELISA, KD K Detect™, IFAT160 IFAT threshold 160, IFAT80 IFAT threshold 80	IFAT160	IFAT80	9.1% (8/88)	92.1% (105/114)	55.9% (113/202)
		QL	12.5% (11/88)	93.0% (106/114)	57.9% (117/202)
		KD	26.1% (23/88)	83.3% (95/114)	58.4% (118/202)
IFAT160	IFAT80	QL	25.0% (4/16)	76.9% (10/13)	48.3% (14/29)
		KD	25.0% (4/16)	92.3% (12/13)	55.2% (16/29)
		IFAT160	62.5% (10/16)	61.5% (8/13)	62.1% (18/29)
IFAT80	Other dogs	IFAT80	75.0% (12/16)	38.5% (5/13)	58.6% (17/29)
		QL	29.2% (19/65)	70.7% (29/41)	45.3% (48/106)
		KD	3.1% (2/65)	95.1% (39/41)	38.7% (41/106)
IFAT160	IFAT80	IFAT160	29.2% (19/65)	81.0% (34/42)	49.5% (53/107)
		IFAT80	46.1% (30/65)	64.3% (27/42)	53.3% (57/107)
		QL			

Symptomatology, bioclimatic level and function performed are all independently associated with the diagnosis of CanL ($p < 0.05$): bioclimatic level being equal, dogs with clinical symptoms are 2.7 times more likely (CI, 1.1-6.7) to test positive to two of the four diagnostic techniques; clinical category being equal, dogs from the Mesomediterranean are diagnosed with CanL 81.8% more often (CI, 1.0-3.2) than those from the Thermomediterranean. Lastly, clinical category and bioclimatic level being equal, guard dogs test positive to two techniques simultaneously 4.2 times more frequently than those kept as pets (CI, 1.8-9.5).

IFAT technique and uncertain titres

All DSCCanL dogs displayed antibody titres with IFAT ≥ 40 , with the distribution of these titres being different to that of the DSR dogs (Fig. 63). In contrast to the DSR group, 39.4% of the DSCCanL dogs had antibody titres above 1,280. Of the dogs, 43.7% tested positive to three techniques, 15.5% to two, whilst 19.7% tested negative to all the techniques. These percentages barely change when the IFAT threshold is lowered to 80 (43.7%, 16.9% and 15.5% respectively).

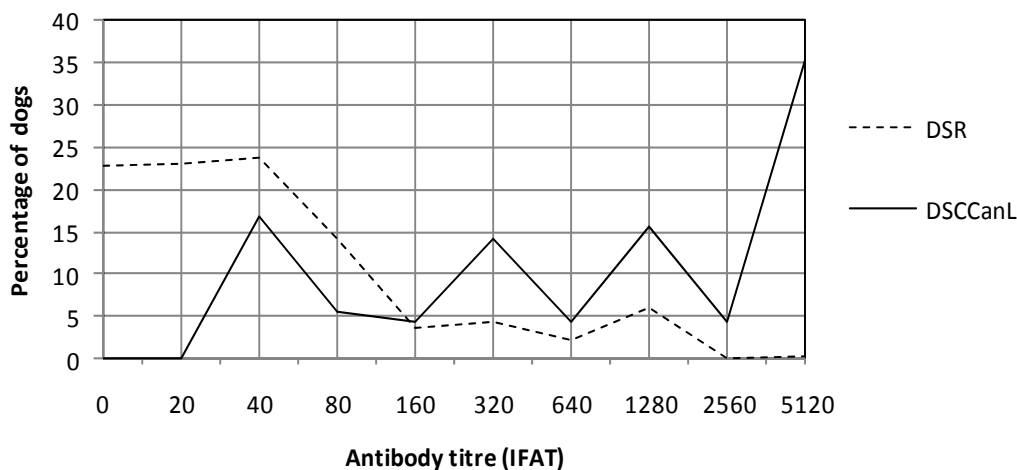


Fig. 63. Comparison of antibody titres obtained with the IFAT technique in the animal groups sampled at random (*DSR*) and with symptomatology compatible with CanL (*DSCCanL*).

With the IFAT technique, both the DSR and the DSCCanL groups produced high percentages of animals with uncertain antibody titres (61.2% and 22.5% respectively, when the threshold was 160); the QLE technique also produced 7.2%

and 1.4% of uncertain titres respectively. Uncertain titres were more frequent in asymptomatic than in symptomatic dogs, even in the DSR group, in which 94.9% of the animals with uncertain IFAT results and 100% of those with uncertain QLE results are asymptomatic. The positivity of a proportion of these animals is confirmed via the other techniques, thus among the DSRs, 15.8% of the uncertain IFATs (12.3% of those with a titre of 20, 17.1% of those with 40 and 21.3% of those with 80) and 4.3% of the uncertain QLEs test positive to two or more techniques. Of the DSRs, 12.5% of the uncertain IFATs are confirmed as positive by one of the other serological techniques. Unfortunately, we were unable to perform the PCR technique for this group of dogs, which would probably have returned positive results in all or in the majority of cases. The existence of animals with uncertain diagnosis in the DSCCanL group, in which the majority are expected to display titres above the established threshold, confirms that a percentage of the DSR group with uncertain titres are *L. infantum* positive. Acedo-Sánchez et al. (1998) found that in an endemic CanL area, 22% of dogs testing seronegative at the beginning of the transmission period reach titres of 20-40 by the end of this, which corresponds with a pre-patent period, 8.4% go into remission of the infection and 25% display a highly fluctuating serology from 1 month to the next; the latter may be due to cross-infections. For Cabral et al. (1992), dogs in the pre-clinical stage represent 30-40%, whilst 10-30% are cases in remission. Cross-reactions with antigens of other infectious species common to the canine host have also been cited as a cause of these low antibody titres. Among these agents, we find *Ehrlichia canis* (Maia and Campino 2008; Otranto et al. 2009), *Babesia canis* (Mancianti et al. 1996), *Sarcocystis cruzi*, *Hepatozoon canis* and *Neospora caninum* (Adel et al. 2010). Another possible explanation for these uncertain values is the presence of latent forms of the disease, giving rise to asymptomatic animals but will nevertheless have significant epidemiological repercussions, since they continue to be infective for the vector sandflies (Molina et al. 1994). In experimental infection models it has been shown that even when using the same method of inoculation, with animals under controlled experimental conditions, and the same strain of parasite at a certain concentration, the humoral immune response developed has not followed similar patterns (Abranches et al. 1991; Carrera et al. 1996).

Concordance between techniques

In the group of dogs sampled at random, concordance between the diagnosis of CanL by PCR and by serological methods with two or more techniques testing positive per animal is slight (4.2%), and that displayed among the serological techniques themselves is also slight/fair. The kappa values are equally low in the two bioclimatic levels. The correlation obtained between the QLE and KD methods in the DSCCanL group was higher (69.1%) than that achieved with the DSRs (10.3%). QLE and KD are serological methods based on the use of different proteins with different antigenic properties, which is reflected in the low concordance of the results obtained, especially in the DSR group. Various authors have confirmed that the specific humoral response to many chemically synthesized antigens - among which we find some of the precursors of protein Q (P2a, P2b, P0, H2A) - or to naturally established infection due to *L. infantum* itself can alter as the disease runs its course (Nieto et al. 1999; Quinnell et al. 2003; Solano-Gallego et al. 2001). In addition, several studies performed in humans have shown that individual immune response is heterogeneous, and using techniques based on sero-responses to a set of antigens could provide better results than monospecific diagnostics such as based on rK39 or others (Srividya et al. 2011). Modification of the positivity thresholds, both with the IFAT technique and QLE, did not bring about significant variations in concordance (results not shown). With regard to the low correlation between the PCR-ELISA and the other serological methods, Monteiro-de-Andrade et al. (2006) obtained kappa values <0.4 with *Leishmania chagasi* in dogs from an endemic area of Brazil between the IFAT technique (threshold = 1:40) and a kDNA PCR-RFLP. It is accepted nowadays that some seropositive animals can produce negative PCR results without it being known for sure whether this is due to cross-reactions in the serology or to an evolution of the infection with a reduction/disappearance of the parasite load but not, in turn, of antibody levels (Quinnell et al. 2001). Moreover, the use of peripheral blood for molecular diagnosis may imply a reduction in the sensitivity of this technique (Maia and Campino 2008; Mathis et al. 1995; Solano-Gallego et al. 2001). We must also not forget that serological techniques detect a history of contact with the parasite but not necessarily its presence (Ashford et al. 1995; Solano-Gallego et al. 2001).

Sensitivity and specificity of results

In the random study in which 94.0% of the dogs were asymptomatic, and with PCR as reference, KD was the least sensitive technique (8.3%, Table 17). In the DSCCanL group, using IFAT with a threshold of 160 as reference, this technique was more sensitive and specific (70.9% and 93.8% respectively) than QLE (60.0% and 87.5%). Miró et al. (2008) also obtained low sensitivity values when they used tests based on the protein rK39 with asymptomatic animals. Conversely, in a study carried out by Reithinger et al. (2002) with dogs from an endemic area of Brazil, the specificity of the results obtained with methods based on protein rK39 was very low, whilst the sensitivity remained at the same levels as the reference technique (ELISA). Although at first this discrepancy in data may seem paradoxical, this has already been discussed in previous studies, with the possibility that these tests behave differently when they are applied in scenarios of differing epidemiological characteristics (Dogan et al. 2005; Otranto et al. 2004), with very similar results in human leishmaniasis (Chappuis et al. 2006; de-Assis et al. 2011). In a recent study performed by the WHO (2011), in which they compared a series of commercial diagnostic tests based on proteins rK39 (KD was among these) and rKE16 on patients with visceral leishmaniasis, the results indicate that the sensitivity and specificity of these tests were conditioned by the continent being studied, obtaining the lowest percentages in East Africa, followed by Brazil, and the highest on the Indian subcontinent, with values close to 100%. Likewise, variations in these diagnostic properties were recorded among laboratories taking part in the trial and belonging to the same continent, with the highest variability being encountered in East Africa and the lowest in India. A review of the available literature on rK39 has provided identical data to those obtained in field studies conducted by the WHO (Srividya et al. 2011). We have found that, in general, the diagnostic sensitivity of commercial serological techniques differs in the two bioclimatic levels, whilst IFAT behaves in a similar way (Table 17). The KD technique displays greater diagnostic sensitivity in the Thermomediterranean and QLE in the Mesomediterranean, the latter bioclimatic level being characterized by a greater CanL prevalence than the former (Martín-Sánchez et al. 2009). The diagnostic sensitivity of the serological methods is also generally higher in the symptomatic DSR group than in the asymptomatic ones

belonging to the same group, corroborating the differences found between the DSR and DSCCanL groups. The serological techniques also have different diagnostic properties in dog groups of different functional types, thus while IFAT and KD are shown to be more sensitive in the guard dog group, QL displays more similar sensitivities across the different groups.

Conclusions

Based on the results obtained, we can deduce that when we estimate CanL prevalence in a given area, the diagnostic technique used will bear an influence, and its sensitivity and specificity will in turn depend on variables such as the presence of clinical signs or the function which the dog performs, as well as the epidemiological characteristics of the area under study. This must be taken into account when comparing endemicity in different geographical areas, such as in studies carried out for the construction of risk maps (Franco et al. 2011). Using more than one technique, and adopting the criterion of considering an animal to be positive only when it has been diagnosed as such by more than one technique, considerably raises the prevalence values but maintains the differences between areas with different characteristics. We support the validity of the IFAT with a threshold of 160 for the diagnosis of CanL due to it being the most efficient technique, and to it behaving in a similar way in scenarios of differing epidemiological characteristics. We consider that increasing the sensitivity of this technique by lowering the threshold from 160 to 80 does not compensate for the drop in specificity that this produces.

Ethical standards

The authors declare that all experiments included in this article comply with the current laws of Spain.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgement

To the “Ministerio de Educación y Ciencia” (Madrid, Spain) by the Projects AGL2004-06909-C02-02/GAN and CGL2007-66943-C02-02/BOS; and to the “Junta de Andalucía” (Sevilla, Spain) by subsidizing the group CVI176.

References

- Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL (1991) An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 13:537-550
- Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J, Vélez-Bernal ID, Sanchís-Marín MC, Louassini M, Maldonado JA, Morillas-Márquez F (1996) Leishmaniasis Eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, southern Spain). *Int J Parasitol* 25:303-310
- Acedo-Sánchez C, Morillas-Márquez F, Sanchís-Marín MC, Martín-Sánchez J (1998) Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Vet Parasitol* 75:1-8
- Adel A, Saegerman C, Speybroeck N, Praet N, Victor B, De-Deken R, Soukehal A, Berkvens D (2010) Canine leishmaniasis in Algeria: True prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Vet Parasitol* 172:204-213
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004) Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57:1-88
- Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker Jr RH, Badaro R, David JR (1995) Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53:251-255
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L (2008) Canine leishmaniasis- new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24:324-330

- Cabral M, O'Grady J, Alexander J (1992) Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol* 14:531-539
- Carrera L, Fermín ML, Tesouro M, García P, Rollán E, González JL, Méndez S, Cuquerella M, Alunda JM (1996) Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: Infection course antigen markers. *Exp Parasitol* 82:139-146
- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M (2006) A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 333:723–726. doi:10.1136/bmj.38917.503056.7C.
- de-Assis TS, Braga ASC, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, de-Siqueira IC, Costa CH, Costa DL, Holanda TA, Soares VY, Biá M, Caldas-Ade J, Romero GA, Rabello A (2011) Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Med Trop Hyg* 105:81–85
- Díaz-Espiñeira MM, Slappendel RJ (1997) A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands. *Vet Q* 19:69-71
- Dogan N, Ozbel Y, Toz SO, Dinleyici EC, Bor O (2005) Sero-epidemiological survey on canine visceral leishmaniasis and the distribution of sandfly vectors in Northwestern Turkey: prevention strategies for childhood visceral leishmaniasis. *J Trop Pediatr* 52:212-217
- Fernández-Pérez FJ, Méndez S, de-la-Fuente C, Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M, Alunda JM (1999) Short Report: Improved diagnosis and follow-up of canine Leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hig* 61:652-653
- Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A (2007) Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol* 144:162-166

- Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M (1999) Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83:87-89
- Franco AO, Davies CR, Mylne A, Dedet JP, Gállego M, Ballart C, Gramiccia M, Gradoni L, Molina R, Gálvez R, Morillas-Márquez F, Barón-López S, Pires CA, Afonso MO, Ready PD, Cox J (2011) Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology* 14:1-14
- Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R (2010) Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 169:327-334
- Iniesta L, Fernández-Barredo S, Bulle B, Gómez MT, Piarroux R, Gállego M, Alunda JM, Portús M (2002) Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:1137-1141
- Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174
- Lepe JA, Ubeda JM, Morillas F, Guevara DC, Martín-Sánchez J, Guerrero FJ, Sanchís-Marín MC, Perea R (2000) Epidemiology of the leishmaniosis in the nature reserve of Sierra de Aracena and Picos de Aroche (Southwest Spain). *Res Rev Parasitol* 60:113-119
- Maia C, Campino L (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158:274-287
- Mancianti F, Pedonese F, Poli A (1996) Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol* 65:1-9
- 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 Hig* 98:228-232

- Martín-Sánchez J, López-López MC, Acedo-Sánchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Márquez F (2001) Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology* 122:607-615
- 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
- Mathis A, Deplazes P (1995) PCR and In Vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from human and dogs. *J Clin Microbiol* 33:1145-1149
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G (2008) Canine leishmaniosis- new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24:371-377
- Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, García S, García A, Caballero MJ, Molina R (2007) A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res* 101:253-57
- Mohebbali M, Taran M, Zarei Z (2004) Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet Parasitol* 121:239-245
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J (1994) Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:491-493
- Monteiro-de-Andrade H, Barbosa-Reis A, Lopes-dos-Santos S, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ (2006) Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 140:231-238
- Morillas F, Sánchez-Rabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, Sanchís-Marín MC (1996) Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog and vector. *Parasitol Res* 82:569-570

- Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J, Acedo C, Sanchís-Marín MC (1995) Importancia actual de las leishmaniosis en España. *Ars Pharm* 36:19-40
- Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I (1999) Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67:117-130
- Otranto D, Paradies P, de Caprariis D, Stanneck D, Testini G, Grimm F, Deplazes P, Capelli G (2009) Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin Vacc Immunol* 16:337-343
- Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Brandonisio O (2004) Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 42:2769-2770
- Ozerdem D, Eroglu F, Genc A, Demirkazik M, Koltas IS (2009) Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. *Parasitol Res* 106:197-200
- Porrozzi R, Santos-da-Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos-Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G (2007) Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vacc Immunol* 14:544-548
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ (2003) IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 91:161-168
- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw MA, Dye C (2001) Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122:253-261

- Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR (2002) Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 40:2352-2356
- Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes 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* 37:683-693
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M (2001) *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 96:265-276
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C (1998) Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 36:58-63
- Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P (2011) Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res* DOI 10.1007/s00436-011-2680-1
- WHO (1984) "La leishmaniosis". Serie de Informes Técnicos nº 793. Geneva.
- WHO (2010) "Control of the Leishmaniases" Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, 22–26 March 2010. WHO Technical Report Series nº 949. Geneva. p. 1-186
- WHO (2011) "Visceral leishmaniosis rapid diagnostic test performance". Diagnostics evaluation series nº4. WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. p. 1-44

Artículo 5

Reliability of a quantitative *L. infantum*-specific PCR for the diagnosis of canine and human leishmaniasis

Manuel Morales-Yuste ^a, Francisco Morillas-Márquez ^a, Victoriano Díaz-Sáez ^a, Sergio D. Barón ^a, Carmen Acedo-Sánchez ^b, Joaquina Martín-Sánchez ^a

^a *Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, Granada, España*

^b *Laboratorio de análisis veterinarios ANLAVE, Granada, España*

Sometido en Parasitology International. Marzo 2012.

Abstract

With view to providing a PCR with quantitative capacity (qPCR), in this study we designed a real-time PCR based on a specific PCR-ELISA for *L. infantum*. Our objectives were to determine the sensitivity and specificity of the new qPCR and to check its usefulness for quantifying parasite load. We analyzed canine blood samples from dogs sampled at random and human blood or bone marrow samples from patients with suspected visceral leishmaniasis (VL). One patient with confirmed VL was also monitored. The specificity of the new qPCR was 100% in all cases, whilst sensitivity varied according to group. The new qPCR proved to be an appropriate method for diagnosing canine leishmaniasis (CanL) regardless of whether or not symptoms compatible with CanL were present. We showed that there is an association between presence of symptoms and parasite load in dogs, this load being approximately 3 times higher in the group of dogs

with clinical signs of canine leishmaniasis than in the group of asymptomatic dogs. The parasite loads found in human blood (average value = 3.92 parasites/ μ L of blood) were higher than those detected in dog blood (average value = 0.21 parasites/ μ L of blood) ($p = 0.041$). Our qPCR proved useful for monitoring the evolution of parasite density in the blood of patients being treated for *Leishmania infantum* infection.

1. Introduction

Leishmaniasis is the only parasitic vector-borne disease to have retained its endemic character in South-Western Europe over decades [1]. *Leishmania infantum* is the principal etiological agent involved in this zoonotic disease in which the dog acts as the main reservoir, although other hosts have also been found infected: foxes [2-4], rats [5], horses [6], cats [7-9] and other wild animals [10]. Its prevalence in dogs varies according to region and is influenced by the diagnostic technique used [11]. In the field of veterinary medicine, the importance attributed to canine leishmaniasis (CanL) is high. In humans, whilst the main and most dangerous clinical form is visceral leishmaniasis (VL), it is also responsible for cutaneous and mucocutaneous forms, the latter even more underreported than the former [12]. In any case, the high incidence of canine leishmaniasis contrasts with the low incidence rates in humans, reflecting the role of the immune system in controlling *L. infantum*, when we consider that the level of contact between parasite/human and parasite/dog are quite similar [13].

The accurate diagnosis of leishmaniasis originally entailed confirming the presence of parasites via microscope or cultures of the blood, bone marrow, lymphatic nodes, spleen or skin samples. However, the invasiveness of these procedures for obtaining clinical samples, the excessive amount of time needed to perform the analytical technique, and its dependence on the parasite load in the tissue and the stage of the disease, have meant that these methods have been relegated to the scientific field only. Since then, increasing use has been made of serological methods due to their efficiency and ease of use [14], although they do have a series of limitations, the most notable of these being cross-reactions with other pathogenic species [15,16]. In recent years a multitude of immunochromatographic tests have been developed, commonly known as quick

diagnosis tests, based on the use of recombinant antigens. These tests, however, reveal substantial differences in diagnostic results depending on the geographical region in which the study is conducted, both in the case of humans [17] and dogs [18,19]. The introduction of the polymerase chain reaction or PCR in the diagnosis of leishmaniasis represented an important step, as it provided much higher levels of sensitivity than those obtained with other techniques [20], with specificity levels covering everything from the detection of the *Leishmania* genus to the diagnosis of a concrete species [21,22]. The main limitation of the PCR, which stems from its greater sensitivity, is the appearance of false positives because of contamination between samples, due mainly to the excessive manipulation required in DNA extraction, amplification and detection. These drawbacks are resolved to a large extent by the real-time PCR. This new PCR is based on the use of fluorescent markers which allow us to monitor the formation of amplicons during the reaction. The real-time PCR equipment includes all the components needed for the amplification and detection of the fluorescence emitted by the markers and for *in situ* analysis of the data obtained. It is then possible - using calibration curves and interpolating the results in these - to accurately quantify the parasite density present in the sample.

Moreover, the treatment of leishmaniasis is complex; the drugs used pose various problems including high toxicity and many adverse side effects, to which we should add the emergence of resistant strains and the high cost of these compounds. The use of the same drugs for treating human and canine leishmaniasis in Europe (especially antimonials and, in recent years, miltefosine) has had significant consequences in the development of resistance to these drugs. This translates into residual parasite loads and relapses, which have been reported frequently both in cases of *Leishmania*-HIV co-infection [23,24] and in dogs [25,26]. Thus having a diagnostic method at our disposal capable of monitoring the parasite load in both humans and dogs will allow specialists to anticipate these recurrences and administer the most appropriate treatment and therapeutic procedures accordingly.

With view to providing a PCR with quantitative capacity (qPCR), in this study we designed a real-time PCR based on a specific PCR-ELISA for *L.*

infantum [21]. Our objectives were: i) to determine the sensitivity and specificity of the new qPCR, ii) to test its usefulness in quantifying parasite load.

2. Materials and methods

2.1. Biological samples

1.1. *Canine samples*: Whole blood samples were taken by cephalic vein puncture from 302 dogs selected at random in the Alpujarra region of Granada, an endemic area located in southern Spain. These animals were classified via a preliminary clinical evaluation as dogs with clinical symptoms compatible with CanL or asymptomatic dogs. Samples were also taken from a second group comprising 10 dogs from a rescue shelter known to have a high incidence of CanL, from whom blood was taken at the beginning and end of the vector's maximum transmission period.

1.2. *Human samples*: samples were taken from 17 patients with suspected human VL and stored in our sample bank: the whole blood of 8 patients extracted from the cubital or cephalic vein, and the bone marrow aspirate of 9 patients extracted via bone marrow puncture under hospital conditions. Fourteen of the 17 individuals analyzed were HIV positive. Five whole blood samples were also included in the analysis from one patient with confirmed VL who was evaluated over the period 2006-2008, during which he received anti-leishmanial treatment.

2.2. DNA extraction.

DNA was obtained from 200 μ L of whole blood or bone marrow aspirate using the REAL DNA SSS Extraction Kit (Durviz s.l.u.). Each extract was rehydrated in a final volume of 20 μ L of sterile water through incubation at 65°C for 1 hour, shaking periodically. In order to ensure the absence of contamination at this stage, extraction controls were conducted, consisting of tubes containing sterile water, to which the whole extraction process was applied simultaneously along with the biological samples; one control was used for each group of 7 biological samples. The extracted DNA was kept at -20°C until its amplification by PCR.

2.3. PCR-ELISA.

This was conducted in accordance with the protocol described by Martín-Sánchez et al. [21] using the PCR-ELISA DIG Labeling and PCR-ELISA DIG Detection kits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). In the PCR, the primers 9 (forward): 5'-CAAAAGTCCCCACCAATCCC-3' and 83 (reverse): 5'-AAACCCTGGTCTGGAGGCTTAG-3' amplify a fragment of 75 bp belonging to the kDNA of *L. infantum*. Each sample was analyzed in triplicate, adding 1, 1 and 2 µL of DNA in a final reaction volume of 25 µL. Detection of the amplified product was carried out on a Streptavidin-coated microtitration plate, through hybridization with the *L. infantum*-specific oligonucleotide probe 5'-CCA AAC AGG GCA AAA ACC-3' labeled at the 5' end with biotin, followed by an ELISA. The results were read using a spectrophotometer at a $\lambda=405$ nm. Samples which returned absorbance values ≥ 1 were considered to be positive. When the optical density was ≥ 0.5 and <1 we proceeded to repeat the amplification using 2, 3 and 4 µL of DNA.

2.4. Real-time PCR.

The same fragment of the kinetoplast minicircle amplified in the PCR-ELISA described above was selected as the molecular target, so the same primers – 9 and 83 – were used. In order to establish conditions for the real-time PCR, preliminary optimization tests were carried out using SYBR Green as the detection chemistry (STRATAGENE Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix, Agilent Technologies). In this way the optimal primer concentrations were established, at 150 nM for the forward primer (9) and 350 nM for the reverse (83). The TaqMan® probe was labeled at the 5' end with the fluorophore FAM and at the 3' end with the quencher TAMRA; FAM-CCA-AAC-AGG-GCA-AAA-ACC-CCA-AAA-TGA-AGA-TAMRA. Its concentration was optimized and established at 100 nM. Each sample was analyzed in triplicate with volumes of 1, 1 and 2 µL of DNA in a final reaction volume of 25 µL containing Brilliant® II QPCR Master Mix (Stratagene®). The thermal cycling profile was 95°C for 10min, followed by 36 cycles of 95°C for 30s and 60°C for 1min, carried out on a Stratagene® MX3000P PCR system.

The results were expressed in the form of curves relating the intensity of the fluorescence emitted to the amplification cycle, the threshold cycle (Ct) being the one at which the fluorescence rises significantly above the background. The Ct

Resultados

value is directly related to the initial concentration of target DNA in the biological sample.

2.5. Standard curve.

In order to use the real-time PCR as a quantitative PCR, a curve with standards (samples with known parasite concentrations) must be constructed in which to interpolate the Ct results obtained with the biological samples. The curve (Fig. 64) was thus created using DNA equivalent to 1000, 500, 250, 62.5, 15.6, 3.9, 0.9 and 0.09 promastigotes (expressed logarithmically). Serial dilutions were performed from an initial DNA concentration equivalent to 1000 promastigotes/ μ L produced through DNA extraction (REAL DNA SSS Extraction Kit, Durviz s.l.u.) of promastigotes of the *L. infantum* strain MCAN/ES/90/DP204 (zymodeme MON-1), cultivated in RPMI-1640, washed in PBS and counted in a Neubauer chamber. The Ct value of each concentration included in the curve corresponds to an average of 4 PCR replicates. The determination coefficient (RSQ) of our curve was 0.975; this is equivalent to the square of the correlation coefficient and measures reproducibility, i.e. the degree of adjustment between the data and the standard curve. The efficiency obtained was 99.5%.

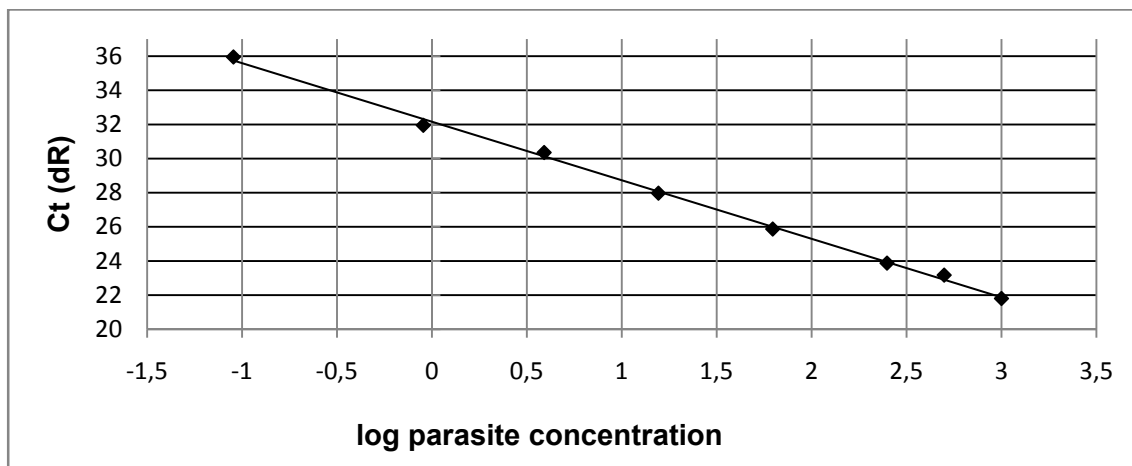


Fig. 64. Standard curve. Four qPCR replicates of each dilution from 1000 to 0.09 parasites/ μ L expressed logarithmically (abscissa) versus Ct values (ordinate). Coefficient of determination or RSQ: 0.975, $Y = - 3.333 * LOG (X) + 32.02$, Efficiency = 99.5%.

2.6. Analysis and statistical treatment of results.

The parasite load was obtained interpolating the Ct values obtained for each biological sample in the calibration curve. The final parasite density data

were expressed in terms of number of parasites/ μL of whole blood or bone marrow and were calculated from the values returned in the different replicates (1, 1 and 2 μL) taking an adjusted average.

To evaluate the diagnostic power of the qPCR, we calculated sensitivity (S), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and efficiency (Ef), taking the PCR-ELISA as the reference in the different groups undergoing analysis:

$$S = [\text{n}^\circ \text{ true positives} / (\text{n}^\circ \text{ true positives} + \text{n}^\circ \text{ false negatives})] \times 100$$

$$Sp = [\text{n}^\circ \text{ true negatives} / (\text{n}^\circ \text{ true negatives} + \text{n}^\circ \text{ false positives})] \times 100$$

$$VPP = [\text{n}^\circ \text{ true positives} / (\text{n}^\circ \text{ true positives} + \text{n}^\circ \text{ false positives})] \times 100$$

$$VPN = [\text{n}^\circ \text{ true negatives} / (\text{n}^\circ \text{ true negatives} + \text{n}^\circ \text{ false negatives})] \times 100$$

$$Ef = [\text{n}^\circ \text{ true negatives} + \text{n}^\circ \text{ true positives} / (\text{n}^\circ \text{ true negatives} + \text{n}^\circ \text{ false negatives} + \text{n}^\circ \text{ false positives} + \text{n}^\circ \text{ true positives})] \times 100$$

Furthermore, we investigated the possible association between parasite load and the presence of clinical symptoms using lineal and logistic regression analysis. The differences between techniques or sample groups were considered significant when the p value was < 0.05 . The statistical analysis of the data was carried out using the SPSS 15.0 software for Windows.

3. Results and discussion

3.1. Sensitivity and specificity of the real-time PCR.

Table 18 summarizes the diagnostic capacity of the qPCR compared with the classic PCR from which it is derived, in all the sample groups analyzed and divided according to the type of tissue used in the case samples taken from humans.

The specificity of the new technique was 100% in all the sample groups, whilst the sensitivity was lower (average value=75.9%; $p < 0.001$) and varied according to group. Sensitivity levels therefore oscillated between 62.5% and 100%, affecting the NPV.

Groups of samples analyzed		Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Efficiency
Randomly sampled dogs in an endemic area	All samples	75.8%	100.0%	100.0%	81.0%	88.1%
	Month 1	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
Dogs from shelter with high canine leishmaniasis incidence	Month 4	62.5%	100.0%	100.0%	40.0%	70.0%
	All samples	72.7%	100.0%	100.0%	75.0%	85.0%
	Bone marrow	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
Patients with suspected visceral leishmaniasis	Whole blood	75.0%	100.0%	100.0%	80.0%	87.5%
	All samples	90.0%	100.0%	100.0%	87.5%	94.1%

Table 18. Diagnostic capacities of qPCR compared with PCR-ELISA. Months 1 and 4 correspond to the beginning and end of the of maximum transmission period. PPV= positive predictive value; NPV= negative predictive value.

Martín-Sánchez et al. [21] developed the PCR-ELISA used in this study, which has as its target a sequence of the *L. infantum* kinetoplast minicircle. The selection of molecular targets represented by multiple copies in the genome of the parasite lends greater sensitivity to the technique than those comprising only one copy [27]. Weirather et al. [28] found that multi-copy sequences of kinetoplast DNA are the most sensitive and useful for designing a qPCR. With the classic PCR-ELISA, it is possible to detect 1 fg of *L. infantum* genomic DNA mixed with the host DNA in a sample [21]. According to Quaresma et al. [26] a parasite contains approximately 300 fg of DNA, so the sensitivity of the PCR-ELISA would be equivalent to 0.003 parasites. However, the newly designed qPCR displayed lower sensitivity, detecting a minimum of 0.09 parasites (Fig. 64). This is due to the fact that the hybridization and ELISA stages associated with our reference PCR increase this sensitivity. Furthermore, the two techniques also show differences in the physicochemical conditions of the reaction and the probe used. It is also worth noting that the minimum detection limit of both is multiplied by 10 when the results are expressed in µl of blood or bone marrow, given the concentration produced of these samples in the DNA extraction phase. In other studies which made use of electrophoresis as the detection method for the amplified product, the classic PCR proved to be less sensitive than the qPCR [29]. Bastien et al. [30] conducted a detailed analysis of the factors affecting the sensitivity of both the classic PCR and the qPCR, revealing that the latter is not necessarily more sensitive than the classic kind and advising us to avoid this kind of generalization.

Apparently, for the samples of canine origin, the sensitivity of the newly developed qPCR was lower than that attained with the human samples, which could be attributed to the exclusive use of blood in the case of the dog analyses. However, in the animals from the shelter with a high CanL incidence, we recorded a 30% reduction in the efficiency of the qPCR (Tables 18 and 19) between the first and second diagnosis; this may indicate that this technique is less capable of detecting recently acquired infections with *L. infantum*, which would be characterized by negative IFATs (results not shown) and parasite loads which are lower than those detected among asymptomatic animals in the study at random, where the efficiency of the new technique was not reduced.

Dog	Date (month)	PCR-ELISA result	qPCR result	Parasite load/ μL blood
1	1	-	-	0
	4	+	+	2.84
2	1	-	-	0
	4	+	-	0
3	1	-	-	0
	4	+	+	0.09
4	1	-	-	0
	4	-	-	0
5	1	+	+	0.54
	4	+	+	0.10
6	1	-	-	0
	4	-	-	0
7	1	+	+	0.09
	4	+	-	0
8	1	-	-	0
	4	+	+	2.74
9	1	+	+	1.17
	4	+	+	0.09
10	1	-	-	0
	4	+	-	0

Table 19. Individual results obtained for dogs from the rescue shelter with high CanL incidence. Samples were taken at the beginning (month 1) and end (month 4) of the maximum transmission period and analyzed by PCR-ELISA and qPCR.

3.2. Quantification of parasite load.

Table 20 shows the results obtained with both molecular methods in the two dog groups studied, distinguishing between animals with and without clinical signs compatible with CanL. Of the 302 canine samples analyzed at random in the

Resultados

endemic area, only 20 (6.1%) came from animals with symptoms compatible with CanL. The PCR-ELISA was able to detect 10 positive dogs (50%) among these symptomatic animals, whilst with the qPCR, 7 (35%) were detected. The qPCR shows the same diagnostic capacity in both groups of animals ($p=0.706$). The prevalence values in symptomatic and asymptomatic animals were very similar (Table 20), a factor which tallies with CanL being considered a disease with variable incubation periods in which most infected animals can remain asymptomatic carriers all their lives [18].

Groups of dogs sampled		PCR-ELISA +/N (%)	qPCR +/N (%)	Average parasite load/ μ L blood in qPCR positive animals [range]	
Randomly sampled dogs	Symptomatic	10/20 (50.0%)	7/20 (35.0%)	0.79 [0.10-4.27]	S.D: 1.538
	Asymptomatic	138/282 (48.9%)	105/282 (37.2%)	0.11 [0.09-2.31]	S.D: 0.284
Dogs from shelter	Month 1	3/10 (30%)	3/10 (30%)	0.57 [0.09-1.17]	S.D: 0.580
	Month 4	8/10 (80%)	5/10 (50%)	1.16 [0.09-2.84]	S.D: 1.490
Total positive dogs		159/322 (49.4%)	120/322 (37.3%)	0.21 [0.09-4.27]	S.D: 0.582

Table 20. Percentage of positive dogs and parasite loads. Animals sampled at random in an endemic area are grouped as symptomatic or asymptomatic dogs. It also includes results obtained with dogs from the rescue shelter with high CanL incidence at the beginning (month 1) and end (month 4) of the maximum transmission period. +=number of positive dogs; N=total number of samples.

A low percentage of animals in the group of dogs sampled at random in an endemic area had parasite loads higher than 1 parasite/ μ L of blood. To be precise, 1% of these dogs had parasite loads ranging from 1.17 to 4.27, with an average value of 2.43 parasites/ μ L of blood. Francino et al. [29] associated these values above and below 1 parasite/ μ L of blood with the absence or presence of symptoms respectively.

In our case, the logistic regression analysis revealed that an association exists between symptomatology (dichotomous dependent variable; 0 = without symptoms, 1 = with symptoms) and parasite load (continuous independent variable), this load being 2.8 times higher in the group of dogs with symptoms compatible with CanL than in the asymptomatic dog group (IC 95% [1.1-7.3], $p=0.039$). This figure was 3.2 times higher when dogs with no detected parasitemia were excluded from the analysis (IC 95% [1.1-9.5], $p=0.037$). Similar results were obtained with this second group of animals through a lineal

regression analysis using parasite load as the dependent variable and the presence of clinical signs as the independent variable. Carson et al. [31] also found a positive association between the logarithm of the parasite load and the presence of clinical symptoms on analyzing dog bone marrow samples in Brazil.

In terms of disease control, it is important to correctly diagnose these asymptomatic dogs, as they will continue to act as reservoirs of infection and remain infective for the vector sandflies [32]. In a canine blood bank in Barcelona, it was reported that the prevalence via qPCR of a group of seronegative and asymptomatic animals had reached 19.6% [33], indicating that the absence of clinical symptoms cannot be used as a filtering criterion and that confirmation is required using other diagnostic procedures. The PCR is without doubt the most appropriate technique for diagnosis in these animals, as we were recently able to demonstrate with the PCR-ELISA of reference [11] and in this study with the qPCR.

Our analysis did not include human samples from asymptomatic individuals, but results obtained by other authors would suggest that the association reported in the canine study between parasitemia and presence/absence of symptoms compatible with CanL may also be true in humans [34].

The parasite loads found in human blood (average value =3.92 parasites/ μ L of blood) were higher than those detected in dog blood (average value =0.21 parasites/ μ L of blood) ($p = 0.041$). Aoun et al. [35] also described very low levels of parasitemia in dogs, lower than those found in human blood. The density in human bone marrow aspirates was higher than that found in blood, with an average value of 1,538.30 parasites/ μ L of tissue. Using a qPCR targeting ribosomal DNA, Antinori et al. [36] detected an average parasite load in human blood samples which was 6.5 times lower than in bone marrow; in our case it is 400 times lower. Studies conducted on a group of dogs from an endemic area of Brazil returned similar results to those we obtained for the human samples, leading us to conclude that the greater presence of parasites in bone marrow is due to this tissue acting as the reservoir for the parasite, whilst the blood is more like a means of transport [26].

Some authors believe that the low concentration of parasites present in blood samples may increase variability across aliquots and affect the results [37], although undoubtedly the great advantage of blood samples is that no overly invasive methods are used to obtain them.

The results obtained for the dogs from the rescue shelter (Table 19) confirmed its suspected status as a microfocus with a high incidence of CanL. In fact, in the 4 months taken to conduct the study, 5 new cases of CanL arose. The low parasite loads of two of these prevented their detection with the qPCR. Undoubtedly, the fact that large numbers of dogs, many of which have CanL, cohabit in close proximity, is acting as a risk factor, facilitating the transmission of *L. infantum* via its main vector, *P. perniciosus* [38].

3.3. Monitoring of patient with visceral leishmaniasis undergoing anti-leishmanial treatment.

Medical history and anamnesis: Male, 51 years of age, with habitual residence in rural surroundings within an endemic area for leishmaniasis. The clinical symptoms started in July 2005 and consist of recurring and irregular fevers, hepatosplenomegaly and joint pain. When lymphoma was suspected, the patient embarked upon an endless series of medical appointments which went on for several years and included 4 hospital admissions with negative test results for lymphoma. In November 2005 he had a splenectomy and a hepatic biopsy was performed due to an undefined autoimmune disease being suspected, although leishmaniasis analysis was not requested. In 2006 he began treatment with prednisone, but no improvement in clinical symptoms was noted. In December that year, blood was taken to test for visceral leishmaniasis, which was confirmed with all the diagnostic tests used: IFAT, titre 40.960; positive *L. infantum*-specific PCR-ELISA; amastigotes were observed in the buffy coat and a parasite culture in EMTM medium was grown which was identified via isoenzyme electrophoresis as *L. infantum*, zymodeme GR1 = MON-1.

The quantification of parasites in peripheral blood samples with the qPCR show a variable parasite kinetic over the course of the monitoring period, with oscillations in parasite load pre- and post-treatment (Fig. 65). These oscillations were recorded by Mary et al. [24,34] both in patients who refused the

leishmanicidal treatment and in individuals who suffered relapses due to resistance of the parasite to this treatment. The patient was treated with Amphotericin B on days 21, 26 and 33 post-initial diagnosis. Two months after the treatment (day 99) the parasite load had increased in comparison to day 36, indicating that the treatment had failed, perhaps due to its brief duration. Two years later (day 726), the patient still displayed low levels of parasites in the blood and the clinical symptoms continued. Just as we have pointed out in reference to dogs, several authors maintain that increases in the parasite load coincide with periods of greater clinical manifestations in patients infected with *Leishmania* [24,34,36]. The patient's clinical manifestations were exacerbated at the moment of greatest parasitemia and isolation of the parasite (day 6), these mainly being intense itching, thoracic skin problems of an allergic type, joint pain, intermittent fever and feeling generally unwell.

Resultados

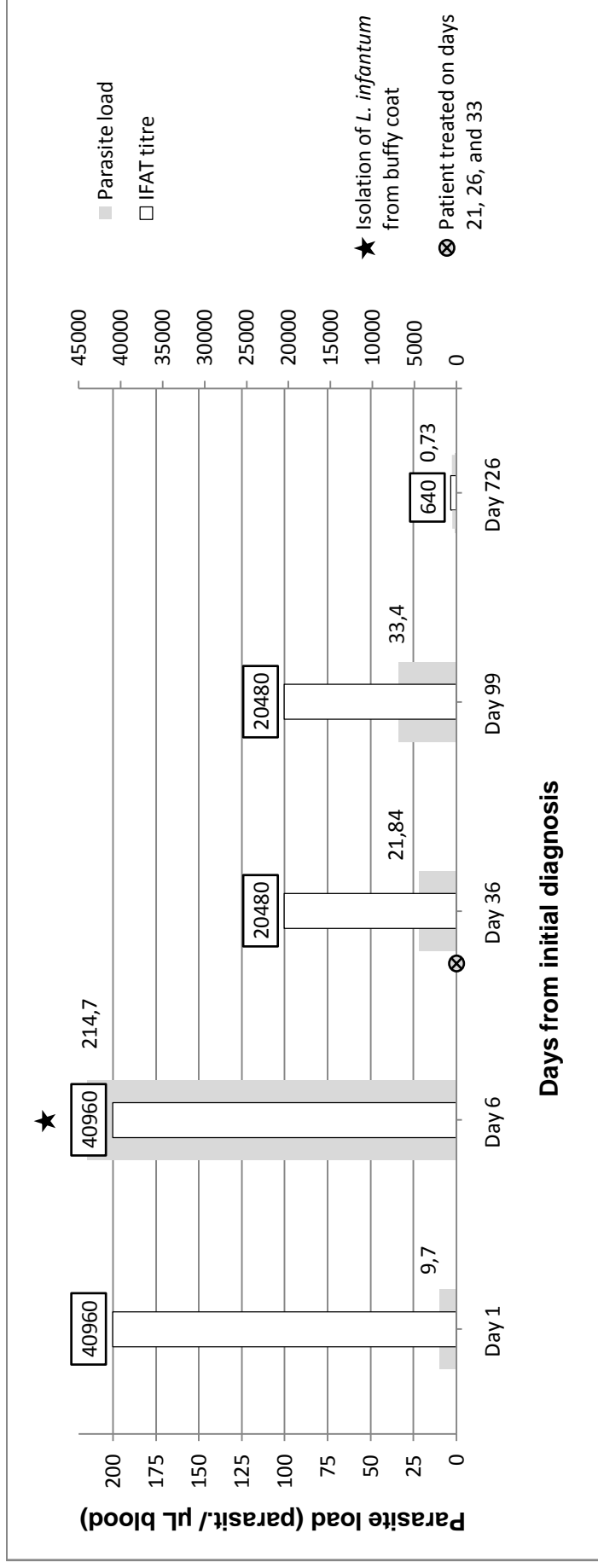


Fig. 65. Temporal evolution of parasite load in the patient undergoing monitoring. This patient was treated with Amphotericin B on days 21, 26 and 33 post-initial diagnosis. All samples were PCR-ELISA positive. The values framed correspond to IFAT titres.

4. Conclusions

The new qPCR was generally less sensitive than the PCR-ELISA, except when bone marrow aspirate was used for the diagnosis of human VL. The specificity was no different from that of the reference technique, staying at 100% in all cases. In spite of this, the qPCR was able to detect a minimum of 0.09 parasites/ μL , which permitted quantification of the parasite load in the whole blood and bone marrow of humans, as well as in the blood of dogs with symptoms compatible with CanL and asymptomatic dogs. This capacity for quantification allowed us to confirm that an association exists between the parasite load and the presence/absence of clinical signs in the canine reservoir, that the parasite load detected in dog blood is lower than that quantified in human blood and that the parasite density in bone marrow is up to 400 times higher than in blood. Furthermore, its usefulness was demonstrated in the monitoring of patients undergoing anti-leishmanial treatment.

Acknowledgements

We are grateful to the “Ministerio de Ciencia e Innovación” by the Projects CGL2007-66943-C02-02 and CGL2010-22368-C02-02 and to the “Junta de Andalucía” by the Project P07-CVI-03249.

References

- [1] Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1013-8.
- [2] Dipineto L, Manna L, Baiano A, Gala M, Fioretti A, Gravino AE, et al. Presence of *Leishmania infantum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Southern Italy. *J Wildl Dis* 2007;43: 518-20.
- [3] Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 1999;83:87-9.

- [4] Verin R, Poli A, Ariti G, Nardoni S, Fanucchi MB, Mancianti F. Detection of *Leishmania infantum* DNA in tissues of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Italy. *Eur J Wildl Res* 2010;56: 689-92.
- [5] Morillas-Márquez F, Benavides-Delgado I, Gonzales-Castro J, Reyes-Magaña A, Valero-López A. Découverte de *Leishmania* sp. dans des *Rattus Rattus* de la province de Grenade (Espagne). *Ann Parasitol Hum Comp* 1985;60:768-70.
- [6] Solano-gallego L, Fernández-Bellon H, Serra P, Gállego M, Ramis A, Fondevila D, et al. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equ Vet J* 2003;35:320-3.
- [7] Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol* 2007;145:267-73.
- [8] Ozon C, Marty P, Pratlong F, Breton C, Blein M, Lelièvre A, et al. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet Parasitol* 1998;75: 273-277.
- [9] Pennisi MG, Venza M, Reale S, Vitale F, Giudice S. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun* 2004;28: 363-366.
- [10] Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, et al. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 2008;155:198-203.
- [11] Morales-Yuste M, Morillas-Márquez F, Díaz-Sáez V, Barón-López S, Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J. 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* 2011; doi: 10.1007/s00436-011-2812-7
- [12] Morillas-Márquez F, Barón SD, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Martín-Sánchez J, Acedo-Sánchez C, et al. Situación de la leishmaniosis en Granada (Sur de España) después de 25 años de estudio. *Ars Pharm* 2010;51:85-99.

- [13] Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J, Vélez-Bernal ID, Sanchís-Marín MC, Louassini M, Maldonado JA, et al. Leishmaniasis Eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, southern Spain). *Int J Parasitol* 1996;25:303-10.
- [14] WHO. Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 22–26 March 2010. WHO Technical Report Series no 949. Geneva. 2010. p. 1-186.
- [15] Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra O. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology Research*, On-line. 2011; doi: 10.1007/s00436-011-2680-1.
- [16] Porrozzi R, Santos-da-Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos-Santos CD, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vacc Immunol* 2007;14:544-548.
- [17] WHO. Visceral leishmaniosis rapid diagnostic test performance. Diagnostics evaluation series no 4. WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva. 2011. p. 1-44.
- [18] Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis- new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 2008;24:371-7.
- [19] Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2352-6.
- [20] Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004;57:1-88.
- [21] Martín-Sánchez J, López-López MC, Acedo-Sánchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Márquez F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. *Parasitology* 2001;122:607-15.

- [22] Schöonian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin JC. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol* 2008;24:135-42.
- [23] Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, et al. Real-Time PCR as new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:828-31.
- [24] Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004;42:5249-55.
- [25] Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2008;177:279-82.
- [26] Quaresma PF, Fonseca-Murta SM, de-Castro-Ferreira E, Mariano-da-Rocha-Lima ACV, Prates-Xavier AA, Ferreira-Gontijo CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop* 2009;111:289-94.
- [27] Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002;40:210-15.
- [28] Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol* 2011;49:3892-904.
- [29] Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis *Vet Parasitol* 2006;137:214-21.
- [30] Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR is not more sensitive than "Conventional" PCR. Guest commentary. *J Clin Microbiol* 2008;46:1897-900.

- [31] Carson C, Quinnell RJ, Holden J, Garcez LM, Deborggraeve S, Courtenay O. Comparison of *Leishmania* OligoC-TesT PCR with conventional and real-time PCR for diagnosis of canine *Leishmania* infection. *J Clin Microbiol* 2010;48:3325-30.
- [32] Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:491-3.
- [33] Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruiz-de-Gopegui R. Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J Small Anim Pract* 2008;49:325-8.
- [34] Mary C, Faraut F, Drgoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, et al. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:858-63.
- [35] Aoun O, Mary C, Roqueplo C, Marié JL, Terrier O, Levieuge A, et al. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. *Vet Parasitol* 2009;166:27-31.
- [36] Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, et al. Is Real-Time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis?. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:46-51.
- [37] Schulz A, Mellenthin K, Schönian G, Fleischer B, Drosten C. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based Real-Time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:1529-35.
- [38] Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V, Morillas-Márquez F. Canine Leishmaniasis in Southeastern Spain. *Emerg Infect Dis* 2009;15:795-8.

DISCUSIÓN GENERAL

En la provincia de Granada, las leishmaniosis humanas y caninas son conocidas desde principios del siglo XX (Fernández-Martínez y Camacho-Alexandre, 1913). Estudios anteriores realizados en la comarca de la Alpujarra demuestran la elevada endemicidad que la leishmaniosis canina (LCa) presenta en esta zona (Acedo-Sánchez et al., 1996; Reyes-Magaña et al., 1988). Además, la gran variabilidad orográfica, vegetal y climática de la Alpujarra, representada por los distintos matices bioclimáticos descritos por Rivas-Martínez et al. (1987), hacen que este enclave sea idóneo para el estudio de los aspectos que se han analizado en el presente trabajo.

El 13% de seroprevalencia de LCa obtenida durante la encuesta canina desarrollada en el año 2006 demuestra que la enfermedad continúa siendo endémica en esta comarca, donde los pisos bioclimáticos termomediterráneo y mesomediterráneo han presentado seroprevalencias del 13,3% y 20,1% respectivamente, frente al 1,1% registrado en el supramediterráneo alpujarreño. Al comparar estos porcentajes recientes con los de los estudios de referencia realizados por Acedo-Sánchez et al. (1996) y Reyes-Magaña et al. (1988; 1989) hemos observado que durante el periodo de tiempo estudiado la seroprevalencia de la enfermedad ha aumentado progresivamente en el mesomediterráneo, desde el 9,2% obtenido en el año 1984 al 15,4% en 1991, para terminar con una prevalencia del 20,1% en 2006 ($p = 0.015$). En los restantes pisos bioclimáticos no se han dado cambios estadísticamente significativos en la prevalencia global de la enfermedad, aunque un aspecto destacable ha sido la reducción de estos porcentajes sucedida en el termomediterráneo entre 1984 y 1991, seguida de un posterior aumento entre 1991 y 2006 (11,6%; 3,3% y 13,3% respectivamente; $p = 0,317$).

La economía de la Alpujarra está basada fundamentalmente en la agricultura y la ganadería. Un importante cambio acaecido en este intervalo de tiempo es la desaparición progresiva de las cuadras de animales del núcleo rural, cuya presencia parece ser un importante factor de riesgo para la infección por *Leishmania* (Morillas et al., 1996) pues representan lugares ideales el apareamiento y ovoposición de los flebotomos (Killick-Kendrick, 1987). Moreira et al., 2003, encuentran que el riesgo de LCa es de 3 a 4 veces mayor para los

perros que viven en casas con corrales que contienen animales. Quizás esta desaparición se ha producido en época más temprana en los pueblos con mayor desarrollo turístico del termomediterráneo, y puede haber sido, junto con el intenso control de los perros callejeros realizado por las autoridades sanitarias, causa de la reducción de la seroprevalencia de la LCa en 1991. Estos datos reflejan la influencia que puede haber tenido la actividad humana sobre las poblaciones de los flebotomos vectores, y en consecuencia sobre la prevalencia de la LCa en los entornos implicados.

Con la intención de comprobar si las variaciones en la seroprevalencia de la LCa se encuentran relacionadas con posibles cambios en las poblaciones de los flebotomos vectores de *L. infantum* hemos estudiado la fenología de estas especies en la zona implicada y en la cercana provincia de Almería. Estos resultados fueron comparados con los de sendos trabajos realizados con anterioridad en ambas localizaciones (Morillas-Márquez et al., 1983; Sanchis-Marín et al., 1986). Las especies capturadas por nosotros en 2005 han sido las mismas que las descritas en los mencionados estudios de referencia, excepto un *P. chabaudi* capturado en 1982 en Almería y no encontrado en la actualidad.

Como ya hemos indicado en la introducción, la temperatura ha sido citada en numerosas ocasiones como un factor climático fundamental para la biología de los flebotomos vectores o del propio parásito. Sin embargo, el análisis simultáneo de las variaciones en la temperatura nos ha permitido comprobar que las expectativas de un incremento en la densidad de las poblaciones de los vectores de *L. infantum* (*P. perniciosus* y *P. ariasi*) asociado al aumento de la temperatura no se han cumplido de forma evidente.

Los datos aportados por la Agencia Estatal de Meteorología han confirmado un incremento medio de la temperatura en los puntos de muestreo de los flebotomos de 1,9°C (entre -2,2°C y 6,7°C). Ante este panorama, lo esperable habría sido un aumento en la densidad de las especies de flebotomos afines a los climas semi-áridos y reducción de aquellas afines a los climas húmedos. Sin embargo, las densidades de las dos especies vectoras de *L. infantum* han disminuido en el mesomediterráneo granadino y se han mantenido constantes en las restantes localizaciones. Lejos de traducirse en una disminución de los casos

de LCa en la región mesomediterránea, la seroprevalencia de la enfermedad en este piso bioclimático ha aumentado de forma progresiva. Una explicación probable para este fenómeno sería el aumento que hemos registrado en el periodo de actividad de *P. perniciosus*, tanto al comienzo como al final del periodo de máxima transmisión. Los estudios de Martín-Sánchez et al. (1994; 2006) demuestran que *P. perniciosus* es el principal, o al menos el único vector demostrado en la zona y que *P. ariasi*, cuyo periodo de actividad se ha visto reducido, sólo estaría implicado en la transmisión de *L. infantum* en la cercana región de la Axarquía (Morillas et al., 1996). De estos datos puede deducirse que, en ausencia de otras variables modificadoras, un aumento en el periodo de actividad de *P. perniciosus* tendría mayor influencia sobre la transmisión de *L. infantum* que las disminuciones en la densidad de este vector.

Utilizando las densidades mensuales de las especies de flebotomos vectores de *L. infantum*, así como las oscilaciones en la temperatura ocurridas durante estos meses hemos elaborado una serie de modelos que permiten predecir las variaciones en la densidad de estas especies ante hipotéticos cambios en la temperatura, piso bioclimático y provincia. Gracias a estos modelos hemos sabido que un incremento de 1°C sólo aumentaría la densidad de *P. perniciosus* en el termomediterráneo granadino, mientras que en la restantes localizaciones ésta se vería reducida considerablemente. Si el aumento fuese de 2°C se daría una disminución generalizada de las densidades de *P. perniciosus*. En nuestra zona de muestreo, la temperatura se ha descrito como factor limitante por debajo de un mínimo situado entre 17-18°C, en el cual no son activos los flebotomos (Guevara-Benítez et al., 1978). Estos autores han sugerido que otros factores como la protección frente a los vientos, o la presencia de vertederos en las proximidades explicarían la mayor densidad de flebotomos a altitudes situadas en torno a 1100 metros sobre el nivel del mar; aunque Barón et al. (2011) no han hallado relación entre la presencia de contenedores de basura y la presencia/ausencia de los vectores de *L. infantum*. Martínez-Ortega y Conesa-Gállego (1987) observaron que la densidad y diversidad de las especies de flebotomos disminuían con el aumento de la altitud, y que esta distribución altitudinal obedecía a la idoneidad de las diferentes zonas para su desarrollo. Barón et al. (2011) y Gálvez et al. (2010) también han encontrado asociación

DISCUSIÓN GENERAL

estadística entre la altitud de las estaciones de muestreo y la presencia o densidad, respectivamente, de los vectores.

La provincia y el piso bioclimático son variables representativas de las características ecológicas de los entornos estudiados. Un claro ejemplo de la influencia que podrían ejercer los distintos matices bioclimáticos sobre las poblaciones de *P. perniciosus* lo encontramos en los resultados obtenidos por Sanchis-Marín et al. (1986) en la provincia de Almería; mientras que en las regiones sub-desérticas y continentales la dinámica estacional de esta especie fue bimodal, en las zonas de clima sub-tropical esta dinámica mostró tres picos de máxima densidad (*Phlebotomus/m²*) situados en junio, agosto y septiembre. Además, en los meses de verano la mayor densidad de *P. perniciosus* se registró en julio en la región continental, un mes más tarde que el máximo de densidad obtenido en el ecosistema subdesértico, donde el número más elevado de *P. perniciosus* capturados fue la mitad que en la franja continental.

Es probable que además de los citados aspectos medioambientales existan otra serie de factores relacionados con la actividad humana que, de una forma u otra, podrían influir sobre las poblaciones de flebotomos -modificación de los cultivos de secano a regadío, cambios en el uso del terreno, uso de insecticidas, construcción de autovías o nuevas carreteras, o la referida desaparición de las cuadras de animales-. Estos factores habrían tenido especial relevancia en las provincias litorales andaluzas, ya que entre 1998 y 2004 han experimentado los mayores incrementos urbanísticos, siempre superiores al 10% (Villar-Lama y Ojeda-Zújar, 2007).

Otra diferencia detectada entre ambos pisos bioclimáticos es el incremento de los cultivos de invernadero en el termomediterráneo y del olivo en el mesomediterráneo, frente al abandono del cultivo de los almendros. Ambos tipos de cultivo implican un mayor uso de insecticidas, cuyo empleo como medida de control sobre las poblaciones de flebotomos se viene defendiendo desde hace más de 60 años (Hertig, 1950). El producto más utilizado para el control de éstos y otros vectores ha sido el DDT, aunque su uso se prohibió en España en 1972 y se haya sujeto a gran controversia por la probabilidad de efectos negativos sobre la salud humana y medioambiental (Killick-Kendrick, 1999; Alexander y Maroli,

2003; Sharma y Singh, 2008). Curtis y Lines (2000) opinan que estos efectos negativos han sido sobreestimados y que su utilización en el control de plagas -en especial de la malaria- estaría justificado en condiciones específicas. A mediados de agosto del año 2005, coincidiendo con nuestros muestreos de flebotomos, la Agrupación para Tratamientos Integrados en Agricultura (A.T.R.I.A.) del municipio de Cáñar informó del tratamiento aéreo en banda con dimetoato, a lo largo de 50 hectáreas desde la zona sur del término municipal de Cáñar hasta los límites con el término municipal de Bayacas. Sin embargo, es poco probable que las poblaciones de flebotomos se viesen afectadas, dada la distancia existente entre las estaciones de muestreo y la zona fumigada. Tampoco podemos desestimar la posibilidad de que otros tratamientos hayan sido realizados sin que nosotros tuviésemos constancia de ello.

En lo referente a la modificación de los tipos de cultivo, diversas especies vegetales (*Solanum jasminoides*, *Ricinus comunis*, *Bougainvillea glabra*) han sido incriminadas de ejercer un efecto nocivo sobre los flebotomos que se encuentran en su proximidad y se alimentan de sus zumos vegetales, o sobre el parásito contenido en su intestino (Schlein et al., 1999, 2001), aunque desconocemos si los almendros, olivos u otras plantas de cultivo en invernadero podrían ejercer tales efectos.

Según Gálvez et al. (2010) los vectores de *L. infantum* prefieren ambientes inalterados, representados por zonas rurales no pavimentadas. Estos autores han señalado que otros factores como la orientación, tipo y materiales de los muros, o protección frente a los vientos, afectarían de forma considerable a la densidad de los vectores. Sharma y Singh (2008) han citado que la destrucción de las madrigueras de los roedores o la obstrucción de las grietas de los muros con barro o cal podrían dificultar el proceso de cría de los flebotomos, especialmente la cal por su capacidad para absorber el exceso de humedad del medio. Barón et al. (2011) han descrito que la presencia de *P. perniciosus* es inferior cuando los agujeros de las barbacanas son de PVC y no de piedra, material de uso común cuando se realizaron las investigaciones de referencia sobre las poblaciones de flebotomos.

DISCUSIÓN GENERAL

Además de estos aspectos antropogénicos y medioambientales que afectan a las poblaciones de vectores, existen otros elementos relativos a los propios perros que, mostrando cierta relación con la actividad vectorial, incrementan el riesgo de padecer la enfermedad en el entorno estudiado. El análisis de dichos factores de riesgo asociados a la LCa nos ha permitido identificar varios parámetros entre los que se encuentran la edad, el peso, la aptitud de los animales, si éstos pernoctan en el exterior o dentro de recintos protegidos, o el piso bioclimático en el que los animales se encuentran. Según el modelo de regresión logística multivariante finalmente retenido, el riesgo de padecer LCa en los animales que reúnen todos los factores es 54 veces mayor que el de aquellos que no los presentan. Como decimos, la mayoría de estos factores de riesgo podrían ser explicados teniendo en cuenta las interacciones entre los flebotomos vectores y los reservorios caninos, siendo especialmente evidentes aquellos relacionados con los hábitos de pernocta o aptitud de los animales.

Son pocos los estudios donde se relaciona la actividad desarrollada por los perros con el riesgo de padecer leishmaniosis. La existencia de una posible asociación entre estos aspectos, así como su conocimiento, nos permitiría en determinadas circunstancias tomar las medidas preventivas apropiadas. Nuestros estudios han demostrado que la condición de animal de compañía parece conferir a los perros cierta protección frente a las restantes aptitudes –caza, guarda y pastoreo-. Al analizar los resultados obtenidos con los distintos métodos de diagnóstico en función de dichas aptitudes, la probabilidad de encontrar un perro positivo con dos o más técnicas serológicas fue 4,8 veces mayor en el grupo de los perros de guarda que en los restantes animales. En el caso concreto de los perros de compañía, la probabilidad de obtener resultados positivos con dos o más técnicas fue 4,2 veces inferior que en los de guarda, lo que de nuevo justificaría la situación preferente de éstos últimos en cuanto a exposición a los vectores, especialmente al considerar el carácter exófilo de *P. perniciosus* y que los perros de guarda suelen permanecer la mayor parte, o toda la noche en el exterior de las viviendas. Tampoco debemos descartar la influencia de otros factores y que la variabilidad de prevalencias obtenidas en los diferentes grupos de aptitud sea producto del grado de estrés al que los animales se encuentran

sometidos, o al diferente cuidado que les otorgan sus propietarios. Sin duda, los más cuidados y menos estresados son los perros de compañía, a los que en nuestro modelo corresponde el menor riesgo. En nuestro área de estudio, el porcentaje de animales de compañía ha pasado del 42% en 1991 (Acedo-Sánchez et al., 1996) al 59% en 2006 ($p < 0,001$) lo que, según venimos comentando, habría actuado reduciendo la transmisión junto con otros eventos como la desaparición de las cuadradas de animales en los núcleos de población. Sin embargo, el incremento en la seroprevalencia acontecido durante este periodo hace pensar en la existencia de otros factores implicados en la transmisión de la enfermedad.

Adel et al. (2010) han examinado 462 perros distribuidos en 4 grupos de aptitud, utilizando para ello la técnica de inmunofluorescencia indirecta ($IFI \geq 128$) y dos métodos serológicos comerciales (uno de ellos con la proteína rK39 como antígeno). Estos autores han encontrado diferentes prevalencias en función de la actividad desarrollada por los perros y según el método de diagnóstico utilizado. En nuestro estudio, al comparar tres métodos serológicos -IFI, Q Letitest ELISA *Leishmania* y Kalazar Detect™ Canine Rapid Test- y uno molecular -PCR-ELISA específica de *L. infantum*- también hemos comprobado que la función realizada por los perros tiene influencia sobre la capacidad diagnóstica de la técnica en términos de sensibilidad y especificidad. En lo relativo a las prevalencias, Adel et al. (2010) han observado que el grupo funcional representado por los perros vagabundos fueron los que mostraron mayores porcentajes. Los animales que desarrollan mayor actividad en el exterior se encuentran más expuestos a la acción de los vectores como muestran los resultados de estos autores y los nuestros con los perros de guarda y pastoreo. Una consecuencia de esta exposición sería la elevación de la seroprevalencia y seropositividad en los perros tras los periodos de transmisión. No obstante, un alto porcentaje de estos animales ven reducidos sus títulos de anticuerpos al final del periodo de transmisión a los niveles conocidos como “dudosos” (20, 40 y 80) o incluso se vuelven seronegativos (Acedo-Sánchez et al., 1998).

Con el objetivo de evaluar si el modelo predictivo del riesgo individual de LCa obtenido en el sudeste de España era aplicable a otras zonas hemos realizado un estudio similar en el sudoeste peninsular. En ambos estudios se

utilizó el mismo modelo de encuesta y técnica de diagnóstico serológico (IFI ≥ 160). Paradójicamente, a excepción del riesgo atribuible a la pernocta de los animales en el exterior, los restantes factores de riesgo identificados fueron distintos, e incluso opuestos, como ha sido el caso de la variable “peso”. Al tratarse de una provincia donde predomina el piso bioclimático termomediterráneo, en Cádiz no fue necesario contrastar la influencia de dicha variable, aunque la identificación de un nuevo riesgo relacionado con la proximidad o no a la costa de los perros, nos ha permitido comprobar que, al igual que ocurre en el sudeste peninsular, las características ecológicas del entorno continúan siendo un factor importante en la transmisión de la enfermedad. El riesgo asociado a los animales que viven en poblaciones carentes de costa es 10 veces mayor –a igualdad de los demás factores incluidos en el modelo–, pudiendo ser atribuible a que el entorno costero próximo no es tan adecuado para el desarrollo de los flebotomos vectores como las regiones del interior. Morillas-Márquez et al. (1983) han descrito densidades de las especies vectoras de *L. infantum*, *P. perniciosus* y *P. ariasi*, por debajo de los 60 ejemplares/m² en la costa granadina, mientras que en las estaciones situadas en zonas del interior llegaron a registrarse 250 ejemplares/m². No obstante, estos datos deben ser interpretados con cautela, ya que las características ecológicas de la costa gaditana atlántica difieren radicalmente de las de la costa granadina. Siguiendo esta línea, Morillas-Márquez et al. (1983) ponen de manifiesto que el periodo de actividad de *P. perniciosus* en la zona costera es mayor que en las estaciones del interior de Granada, lo que estaría relacionado con la climatología sub-tropical predominante.

Un último factor de riesgo identificado en el sudeste peninsular, cuya relación con los vectores de *L. infantum* es incuestionable, es la presencia de densidades de *P. perniciosus* ≥ 4 ejemplares/m², el cual elevaría 7 veces el riesgo de LCa (a igualdad de las demás variables consideradas). Volviendo al modelo predictivo basado en la variación de la temperatura, esta variable debería ser considerada ante un hipotético incremento de 1°C en la temperatura media del termomediterráneo de Granada, ya que sus efectos sobre la LCa sólo serían evidentes en aquellos lugares o meses en los que actualmente las densidades de *P. perniciosus* se encuentran por debajo de dicho límite. Por otra parte, la

diferencia de densidades de *P. perniciosus* descrita por Morillas-Márquez et al. (1983) entre la costa y las estaciones del interior de Granada no deberían reducir los casos de LCa, dado que durante casi todos los meses estas densidades superaron a los 4 ejemplares/m². La similitud de las seroprevalencias obtenidas por Reyes-Magañas et al. (1988) entre la costa (10,2%) y la Alpujarra/Valle de Lecrín (12,3%) así lo confirma.

Rioux et al., 1977 estudiaron la evolución de la LCa en Cevennes (Francia) a lo largo de todo el periodo de actividad de los flebotomos y observaron que los casos de LCa se presentaban en aquellas zonas donde la densidad de *P. ariasi* (la especie más abundante e implicada como vector en la zona) fue ≥ 5 ejemplares/m², no incrementándose la prevalencia de la enfermedad cuando la densidad superaba los 20 ejemplares/m².

La IFI ha sido la técnica diagnóstica utilizada en los estudios individuales de riesgo de LCa. El título umbral ≥ 160 fue seleccionado para que los resultados obtenidos fuesen comparables con los de estudios previos realizados en la misma zona (Reyes-Magañas et al. 1988, 1989; Acedo-Sánchez et al. 1996). La comparación de los distintos métodos de diagnóstico ha constatado que si hubiésemos seleccionado otra técnica distinta a la IFI las prevalencias obtenidas habrían sido diferentes. No obstante, la técnica IFI con título umbral ≥ 160 mostró un comportamiento diagnóstico similar -sensibilidad, especificidad- con independencia del piso bioclimático, y no ha visto comprometida su eficiencia en ausencia de sintomatología. La reducción del umbral de positividad a ≥ 80 incrementó la sensibilidad de la técnica, aunque no ha compensado a la caída en la especificidad que hemos registrado. Además, los resultados obtenidos con IFI ≥ 80 fueron proporcionales a los conseguidos con IFI ≥ 160 , tanto por pisos bioclimáticos, como en función de la sintomatología o aptitud de los perros. Estos datos justificarían el empleo de la técnica IFI, tanto en nuestros estudios como en los realizados previamente por otros autores, algunos de los cuales han sido referidos en la tabla 5 de la introducción. En dicha tabla también se puede observar que los umbrales de positividad IFI comparados por nosotros son los más utilizados por otros autores, lo que reafirmaría la importancia de buscar un equilibrio óptimo en la relación sensibilidad/especificidad de la técnica.

DISCUSIÓN GENERAL

Al utilizar los distintos métodos de diagnóstico con las muestras procedentes de los perros reclutados al azar en zona endémica de Granada, hemos observado que la probabilidad de obtener un resultado positivo con dos o más técnicas serológicas en los animales sintomáticos es mayor que en los asintomáticos. Cuando la PCR ha sido incluida entre estos métodos, esta probabilidad se redujo, lo cual ha sido relacionado con la baja concordancia de resultados obtenida entre los métodos serológicos y la técnica molecular, aun siendo esta última la que mayor porcentaje de positivos detectó (49,9%). Alvar et al. (2004) han definido varias situaciones que podríamos encontrarnos en una población heterogénea de perros atendiendo a los títulos de anticuerpos y presencia/ausencia de sintomatología compatible; tanto en los animales con sintomatología compatible con LCa como en los perros asintomáticos una serología negativa, positiva o dudosa son resultados posibles. Éstas últimas han sido asociadas a reacciones cruzadas con otras especies patógenas, aunque los títulos bajos o negativos también podrían deberse a problemas con el método empleado, a fallos en la respuesta inmune del animal –poco comunes-, a fases pre-patentes de la enfermedad o al desarrollo de resistencias asociadas a una respuesta inmune de tipo celular. Considerando que los anticuerpos pueden perdurar entre dos meses y más de dos años tras la curación del animal, la obtención de títulos positivos o dudosos en perros sin parasitemia detectable sería una opción probable. Por otra parte, los perros resistentes o que permanecen en fase latente durante un periodo prolongado de tiempo o de por vida -también denominados estados crípticos de la enfermedad- justificarían la obtención de resultados PCR positivos y serologías negativas. En las zonas de elevada endemidad, donde cada animal podría pertenecer a cualquiera de estas categorías (Bettini y Gradoni, 1986; Cabral et al., 1992; Pinelli et al., 1994; Acedo-Sánchez et al., 1998; Cabral et al., 1998; Iniesta et al., 2002; Baneth, 2008), la discordancia entre métodos serológicos y moleculares parece un hecho evidente.

Con las muestras procedentes de las clínicas veterinarias también hemos podido constatar la existencia de asociación entre la presencia de sintomatología compatible y la positividad de los métodos serológicos. No obstante, algunos perros desarrollan títulos de anticuerpos ≥ 160 sin manifestar sintomatología compatible con LCa, mientras que un porcentaje aun mayor de animales

muestran sintomatología similar a la provocada por *L. infantum* sin ser positivos con IFI (≥ 160). Este segundo caso estaría relacionado con el elevado número de animales que acuden a los servicios veterinarios con otras enfermedades, y tendría especial repercusión sobre el diagnóstico preliminar de la enfermedad basado en la evidencia clínica. Según Ruiz-de-Ybáñez et al. (2009), la mayoría de los veterinarios del sudeste de España consideran que la linfadenomegalia, dermatitis, onicogriposis, pérdida de peso o epistaxis son los mejores indicadores de la leishmaniosis, y un 7% de éstos no emplean métodos de laboratorio para emitir el diagnóstico final.

En los animales con sintomatología patente, la mayor correlación de resultados se ha conseguido con los dos métodos comerciales (Q Letitest ELISA *Leishmania* y Kalazar DetectTM Canine Rapid Test). Aunque la capacidad de ambas técnicas para detectar estados avanzados o fases muy cercanas al desarrollo de la enfermedad ha sido descrita por los fabricantes, un 30,9% de los resultados obtenidos fueron discordantes. Estos datos en un grupo tan homogéneo de animales en cuanto a sintomatología y procedencia apoyarían el hecho de que el empleo de distintas proteínas con diferentes capacidades antigénicas llevaría a la obtención de distintos resultados en algunos perros; probablemente aquellos en los que la respuesta inmune humoral desarrollada fuese menos intensa. Entre los animales seleccionados al azar esta concordancia fue inferior (10,3%), ya que a las diferencias antigénicas propias de los métodos de diagnóstico habría que sumarle la heterogeneidad de la población estudiada. La diferencia en los porcentajes de títulos dudosos obtenidos con IFI (≥ 160) parece ser un buen indicador de que la intensidad de la respuesta inmune desarrollada varía en función del tipo de población analizada; mientras que el 61,2% de los perros seleccionados al azar mostraron títulos dudosos, sólo el 22,5% de los perros procedentes de las clínicas veterinarias mostraron estos valores.

Acedo-Sánchez et al. (1998) han estudiado la evolución de los títulos de anticuerpos durante la época de transmisión. En la mayoría de los casos los títulos dudosos se mantuvieron constantes a lo largo de todo el periodo, se redujeron o sufrieron un ligero incremento para volver a caer. Esta transitoriedad de los títulos bajos de anticuerpos podría ir paralela al historial de contactos de los

DISCUSIÓN GENERAL

reservorios caninos con el vector, ya que aquellos animales expuestos puntualmente desarrollarían una respuesta poco intensa, los que han sufrido varias re-exposiciones al parásito en un intervalo de tiempo breve incrementarían ligeramente esta respuesta para volver a caer y, por último, aquellos que han sufrido re-exposiciones sucesivas durante todo el periodo mantendrían los títulos constantes.

Tampoco podemos olvidar que una parte de los perros con títulos negativos o dudosos alcanzan el umbral de positividad al final del periodo de actividad (7,1% según los datos de Acedo-Sánchez et al., 1998). Centrándonos en los animales muestreados al azar, el 15,8% de los perros con títulos IFI dudosos y el 4,3% de los perros con resultado Q Letitest ELISA *Leishmania* dudoso fueron positivos a 2 ó más técnicas respectivamente, por lo que sería lógico pensar que un porcentaje de estos animales son positivos. Este hecho avalaría la utilización de varios métodos de diagnóstico combinados, especialmente en estudios de tipo epidemiológico donde los porcentajes de animales con títulos dudosos son mayores. La consideración de los animales como positivos cuando ofrecieron positividad con más de una técnica se tradujo en un aumento de las prevalencias obtenidas, y al mismo tiempo se mantuvieron las diferencias de prevalencia entre pisos bioclimáticos. Sin embargo, cuando se consideraron positivos sólo los animales que ofrecieron positividad con tres o más técnicas esta prevalencia se vio reducida, probablemente porque, como venimos comentando, la capacidad diagnóstica de algunas de estas técnicas se vería afectada en mayor o menor medida por la población seleccionada -u origen de los animales-, su condición clínica -presencia o ausencia de sintomatología compatible con LCa-, o incluso factores como son la aptitud de los animales.

Por todo ello podemos decir que no existe una combinación de métodos de diagnóstico aplicable en todos los casos, y que la utilización combinada de más de una técnica es aconsejable, siempre que sus ventajas y limitaciones sean conocidas y que sean seleccionadas en función de las características concretas de la población o animal estudiado.

La detección/cuantificación de la parasitemia mediante métodos moleculares se presenta como una buena opción, aportando una valiosa

información a los resultados obtenidos con otros métodos y ayudando a comprender mejor tanto el significado de los animales con títulos dudosos como la transitoriedad de estos niveles de anticuerpos anti-*Leishmania*. Nuestro análisis, mediante estos métodos moleculares, de un grupo de perros de un refugio con alta incidencia de LCa ha permitido identificar nuevos casos de leishmaniosis y animales que se mantuvieron positivos durante todo el periodo de transmisión, detectándose diferencias en la sensibilidad de las técnicas moleculares utilizadas. Oliva et al. (2006) han expuesto a un grupo de perros a la acción de los vectores en similares condiciones -en perreras abiertas- durante tres periodos de transmisión completos y han observado que los animales positivos con técnicas moleculares (aunque negativos con IFI <160, microscopía y cultivo) mantuvieron este *status* o resultaron negativos con el método molecular al final de dichos periodos. La comparación de los datos obtenidos con ambos métodos moleculares -PCR-ELISA y PCR en tiempo real- informa de que los resultados negativos obtenidos por nosotros al final del periodo de transmisión con la técnica cuantitativa fueron debidos a que dicho método fue menos sensible, y no a que los animales resultasen negativos como han descrito Oliva et al. (2006). Al aplicar los mismos métodos en un estudio transversal, hemos observado que el 11,9% (36/302) de los animales mostraron estas cargas parasitarias no detectables por la técnica cuantitativa, situadas entre 0,003 y 0,09 parásitos/ μ L de sangre periférica. El 99% de los perros positivos mostraron valores inferiores a 1 parásito/ μ L de sangre, mientras que los animales positivos del refugio con alta incidencia de LCa experimentaron un aumento medio de 0,6 a 1,17 parásitos/ μ L de sangre periférica durante la época de transmisión. Este hecho podría guardar relación con la intensidad de exposición a los flebotomos vectores, ya que en los microfocos de leishmaniosis con alta densidad de vectores, como puede ser el refugio con alta incidencia de la enfermedad, la actividad de estos vectores se centraría en un grupo menor de animales y la probabilidad de interacción entre reservorios y flebotomos infectados se vería intensificada durante el periodo de actividad; mientras que en áreas de mayor extensión, como es la comarca endémica alpujarreña, esta interacción sería menos intensa. Vlkova et al. (2011) han demostrado que el 87,5% de los animales de un albergue canino privado situado en una región endémica de Italia con elevada densidad de *P. perniciosus* estuvieron expuestos a la picadura del vector.

DISCUSIÓN GENERAL

Del mismo modo que hemos hallado asociación entre la positividad con los métodos de diagnóstico y la presencia de sintomatología compatible con LCa, también encontramos que la carga parasitaria en los perros con sintomatología compatible con LCa es 2,8 veces mayor que la de los perros asintomáticos. Esta mayor parasitemia debería aumentar la probabilidad de que los vectores quedasen infectados al alimentarse, aunque Molina et al. (1994) no encontraron evidencias de que la sintomatología de los animales estuviese asociada con su capacidad para infectar a *P. perniciosus*. Es probable que existan otros factores, no relacionados con la parasitemia del reservorio canino, que condicionen la mayor o menor susceptibilidad de *P. perniciosus* para infectarse por *L. infantum*.

Como hemos indicado, la incorporación de la PCR en tiempo real a los métodos utilizados ha aportado el valor añadido de la cuantificación de la carga parasitaria, aunque su menor sensibilidad respecto a nuestra PCR-ELISA de referencia hace que esta técnica sea más idónea para seguimiento individual de animales o personas sometidas o no a tratamiento anti-*Leishmania*. Dada la baja parasitemia detectada en la población muestreada al azar, un método más sensible como la PCR-ELISA ofrecería un valor más exacto de la prevalencia real de la enfermedad en este tipo de estudios.

CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia global de la leishmaniosis canina en la Alpujarra de Granada sólo ha aumentado en el matiz bioclimático mesomediterráneo durante el periodo estudiado.
2. Las especies de flebotomos capturadas, en orden decreciente de densidad, han sido *Sergentomyia minuta*, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, *Phlebotomus ariasi* y *Phlebotomus alexandri*. De éstas, sólo *S. minuta* ha aumentando su densidad en los últimos 25 años.
3. El único parámetro registrado cuya variación justificaría el aumento de la seroprevalencia de la leishmaniosis canina en la región mesomediterránea de la Alpujarra granadina ha sido el incremento del periodo de actividad de la especie *P. perniciosus*.
4. Según el modelo predictivo, las expectativas del aumento de la temperatura sobre las poblaciones de los flebotomos vectores de *L. infantum* sólo se verían cumplidas con *P. perniciosus* ante un hipotético incremento de 1°C en la temperatura media del termomediterráneo de Granada.
5. Los perros con pesos superiores a 25 kg, más de 4 años de edad, dedicados a la guarda o pastoreo, que pernoctan en recintos abiertos pertenecientes al termomediterráneo o mesomediterráneo, y en poblaciones donde la densidad de *P. perniciosus* ≥ 4 ejemplares/m² presentan el mayor riesgo asociado con la leishmaniosis canina en la región estudiada. Todos estos factores de riesgo pueden ser explicados mediante relaciones con la actividad de los vectores de *L. infantum*.
6. Los factores de riesgo reconocidos en el sudoeste peninsular fueron distintos a los identificados en el sudeste, por lo que cada foco presenta sus propias características.
7. La inmunofluorescencia indirecta con umbral de positividad ≥ 160 ha presentado un comportamiento diagnóstico similar -sensibilidad, especificidad- en los distintos pisos bioclimáticos y no ha visto comprometidas sus propiedades en animales carentes de sintomatología.

Conclusiones

8. Las eficiencias de las técnicas utilizadas por nosotros en el diagnóstico de la leishmaniosis canina dependen de variables como la presencia de signos clínicos, la función realizada por el perro o las características epidemiológicas de la zona estudiada.
9. El empleo de varias técnicas de diagnóstico combinadas bajo el criterio de aceptar como positivos sólo a los animales que han mostrado positividad con más de una técnica se traduce en un aumento de la prevalencia obtenida, manteniéndose las diferencias entre regiones con distintas características.
10. La PCR en tiempo real es menos sensible que la PCR-ELISA de referencia, con un límite mínimo de detección de 0,09 parásitos/ μ L de sangre o aspirado medular. En todos los grupos de muestras, caninas y humanas, la especificidad de la nueva técnica se ha mantenido al 100%.
11. La PCR en tiempo real ha sido lo suficientemente sensible como para monitorizar a un paciente sometido a tratamiento anti-*Leishmania*, aunque no ha permitido detectar algunas infecciones caninas recientes que fueron adquiridas durante el periodo de máxima transmisión.
12. La parasitemia en las muestras humanas ha sido superior a la obtenida en las muestras de origen canino. En este segundo caso se ha confirmado la existencia de asociación entre la carga parasitaria en sangre periférica y la presencia/ausencia de sintomatología compatible con leishmaniosis canina.

ANEXO.MATERIAL Y MÉTODOS

LOS FLEBOTOMOS

VI.1.1. ÁREA GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO.

Las capturas han sido realizadas en 13 estaciones de muestreo pertenecientes a las provincias de Granada y Almería: 7 estaciones en Granada y 6 estaciones en Almería. Estos puntos se seleccionaron por coincidir con las zonas estudiadas en trabajos previos, realizados en 1978 en Granada y 1982 en Almería (Morillas-Márquez et al., 1983; Sanchís-Marín et al., 1986). Dichos itinerarios fueron elegidos en los estudios de referencia por cumplir con las siguientes premisas:

1. Cada itinerario debía corresponder a una zona de condiciones ecológicas similares.
2. Que estas zonas estuviesen relacionadas con la aparición de casos de leishmaniosis.
3. Que en conjunto permitiesen obtener datos fieles sobre la composición cuali-cuantitativa de la fauna flebotomínea de la zona muestreada.

En Granada, las localidades donde se establecieron puntos de muestreo fueron Loja, Haza Grande, Lanjarón, Órgiva, Torvizcón, Sorvilán y Albuñol. En Almería dichas localizaciones pertenecían a Albánchez, Uléila del Campo, Cobdar, Rioja, Tabernas y Los Gallardos.

Se han escogido aquellos puntos de muestreo que menores modificaciones hubiesen sufrido en los últimos 25 años con la finalidad de reducir en la medida de lo posible el impacto que cualquier cambio del entorno pudiese tener sobre las capturas realizadas.

Itinerario de la provincia de Granada.

Estación 1; Haza Grande.

Estación 2; Loja.

Estación 3; Lanjarón.

Estación 4; Órgiva.

Estación 5; Torvizcón carretera de Albuñol.

Estación 6; Sorvilán.

Estación 7; Albuñol.

Itinerario de la provincia de Almería.

Estación 1; Rioja.

Estación 2; Tabernas.

Estación 3; Uléila del Campo.

Estación 4; Cobdar.

Estación 5; Albanchéz.

Estación 6; Los Gallardos.

VI.1.2. MATICES BIOCLIMÁTICOS DE LA ZONA ESTUDIADA.

Los pisos bioclimáticos en los que se encuadra el área de muestreo se han establecido siguiendo la clasificación de Rivas-Martínez et al. (1987). Así, la zona estudiada queda encuadrada en la región corológica mediterránea, que a su vez está dividida en varias zonas principales o pisos bioclimáticos denominados termomediterráneo, mesomediterráneo, supramediterráneo, oromediterráneo y crioromediterráneo.

Características de los matices bioclimáticos (Rivas-Martínez et al., 1983; Rivas-Martínez et al., 1987):

Piso termomediterráneo. Perfil caracterizado por temperaturas medias anuales que van desde los 17°C a los 19°C y precipitaciones entre 200 mm y 350 mm/año (ombroclima semiárido). La altitud oscila entre 0 y 700 metros sobre el nivel del mar, con inviernos cálidos y heladas estadísticamente posibles entre los meses de diciembre y febrero, pero muy raras.

Las estaciones muestreadas en este piso pertenecen a las localidades de Órgiva, Sorvilán y Albuñol en la provincia de Granada y Rioja, Tabernas y Los Gallardos en Almería.

Piso mesomediterráneo. Con temperaturas medias anuales de entre 13°C y 17°C, este perfil se sitúa a altitudes comprendidas entre los 600 y los 900 metros. Las precipitaciones anuales van desde los 600 mm a los 1000 mm (ombroclima sub-húmedo). Los inviernos en suelen ser templados o frescos con heladas frecuentes entre los meses de octubre y abril.

En Granada las estaciones muestreadas en tipo bioclimático corresponden a las localidades de Loja, Haza Grande y Lanjarón, y en Almería tenemos Albánchez, Uléila del Campo y Cobdar.

Piso supramediterráneo. En este piso las temperaturas son inferiores, entre 8°C y 15°C, con precipitaciones similares a las que encontramos en el mesomediterráneo (1000 a 1600 mm anuales u ombroclima húmedo) e inviernos fríos y prolongados (heladas bastante frecuentes entre los meses de septiembre y mayo). Las altitudes a las cuales habitualmente se da este matiz se sitúan entre los 900 y 1800 metros.

En este piso no se han realizado capturas de vectores, pero sí se han realizado estudios sobre leishmaniosis canina (véase artículo 1, en apartado de resultados).

No se describen las propiedades de los pisos oromediterráneo y crioromediterráneo, dado que ninguna de las estaciones muestreadas se encuentra situada en estos matices bioclimáticos.

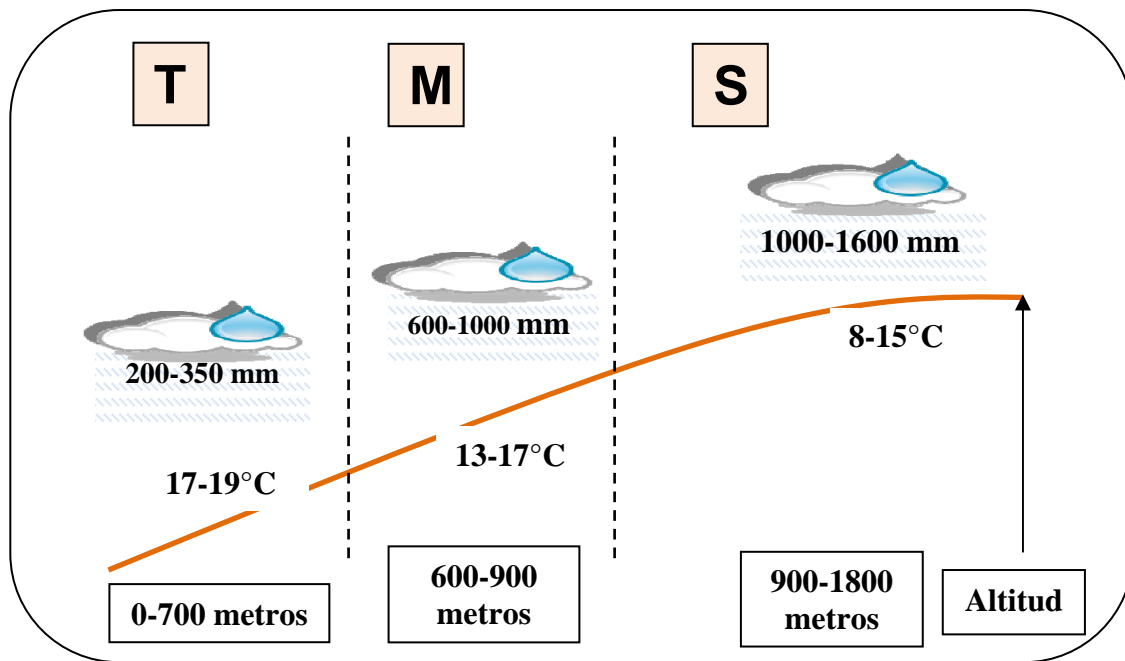


Figura 66. Resumen de las principales características diferenciales de los pisos bioclimáticos. T=termomediterráneo; M=mesomediterráneo; S=supramediterráneo.

VI.1.3. CAPTURA, LIMPIEZA DE LOS PAPELES, MONTAJE Y CLASIFICACIÓN DE LOS FLEBOTOMOS.

VI.1.3.a. Captura de los ejemplares.

Para la captura de los flebotomos se ha empleado un método basado en el uso de papeles impregnados en aceite de ricino denominado método de la “Trampa Adhesiva o Papel Adhesivo”. Dicho método fue seleccionado por Morillas-Márquez F. (1981) por no requerir vigilancia directa de las trampas, ser especialmente apto para realizar un inventario de las zonas de reposo de los flebotomos y no requerir un gran número de personas, pudiéndose cubrir amplias superficies de muestreo.

Este procedimiento utiliza papeles de tipo DIN A4 cuyas medidas son 210 X 297 mm, aunque según el tamaño del hueco pueden ser fragmentados en dos partes iguales (210 X 148,5 mm). Los papeles se introducen en las irregularidades del terreno, fisuras, oquedades, barbacanas o cualquier otro orificio que por sus

especiales condiciones haga prever que es un buen lugar de reposo de los flebotomos. Los folios quedan taponando la abertura del orificio por su propia rigidez y por la presión de los bordes del mismo sobre las paredes del agujero (Fig. 67). Además, deben introducirse con suficiente profundidad (10-20 cm aprox.) como para que no se vean afectados por la influencia del viento, lluvias o por la propia curiosidad de los vecinos de la zona. Así, al entrar o salir los flebotomos de estos puntos de reposo quedarán adheridos a la superficie del papel. El aceite de ricino empleado es de la variedad oficinal por no atraer a otros insectos o pequeños mamíferos que podrían destruir la trampa (Aceite de Ricino, Acofarma®).

Para la preparación de los papeles se dispone una batea de un perímetro algo superior al de los folios que contiene un volumen aproximado de 4 litros de aceite de ricino. A continuación, se introducen los folios previamente separados de uno en uno para que el aceite impregne los papeles centrales. Finalmente, estos papeles se extraen de la bandeja y tras un escurrido grosero se colocan en un recipiente de transporte que está equipado con un soporte de rejilla para que durante el traslado se complete el escurrido. Para evitar que se alteren las propiedades físicas del aceite de ricino las trampas se almacenan en una cámara refrigerada hasta el momento de su uso.



Figura 67. Papel adhesivo colocado en interior de barbacana.

El número de trampas adhesivas colocadas en cada estación de muestreo ha dependido de los agujeros disponibles en dicha localización, debiendo encontrarse lo suficientemente próximas como para que las condiciones medioambientales sean las mismas en todas las oquedades.

Tras la recuperación, los papeles se introducen en sobres auto-adhesivos de fuelle (250 X 353 mm). Cada sobre contiene una estación y está identificado con el código de la estación, nombre de la misma, fecha de retirada y número de trampas recolectadas. Esto permite que no se mezclen folios de distintas estaciones, al mismo tiempo que asegura que no se pierdan ejemplares durante el traslado.

VI.1.3.b. Limpieza de los papeles y montaje de los dípteros.

Una vez en el laboratorio, las trampas adhesivas se extraen de los sobres, y estudiado las estaciones de forma independiente para evitar transferencia de especímenes entre las mismas, se van retirando meticulosamente los flebotomos de los papeles con la ayuda de un pincel de pelo fino humedecido en alcohol de 96°. Estos flebotomos se van poniendo en un vial de 20 mL con alcohol de 96°, conteniendo cada vial una lámina de papel con los datos de identificación. El alcohol permite la eliminación del aceite de ricino de los ejemplares, aunque el tiempo de permanencia en este medio no debe ser excesivo puesto que da lugar a la deshidratación de los mismos y por tanto, a un aumento del riesgo de amputación de las estructuras con las consecuentes limitaciones para la posterior clasificación. Por ello, los flebotomos deben transferirse a otra solución de mantenimiento constituida por alcohol de 70° con glicerina al 4%, que actuará como agente de rehidratación.



Figura 68. Limpieza de los papeles adhesivos.

A continuación se procede a la transparentación de los ejemplares. El medio empleado para tal finalidad recibe la denominación de solución Marc André (Abonnenc, 1972) y está constituido por:

Agua destilada_____30 mL

Hidrato de cloral_____40 g.

Ácido acético cristalizante (glacial)_____30 mL.

El tiempo que los flebotomos permanecen en este medio es variable, pero de forma general se sitúa en torno a los tres días o hasta que los flebotomos adquieran la transparencia necesaria. De igual modo, hemos podido comprobar que un calentamiento de los viales previo al montaje mediante mechero Bunsen, facilita de manera considerable la transparentación y posterior clasificación.

Para finalizar, se procede al montaje permanente de los dípteros. El medio seleccionado ha sido Berlese (Lewis, 1975) cuya composición es:

Goma arábica_____12g.

Hidrato de cloral_____20g.

Acido acético glacial_____5 mL.

Glucosa 50%_____5 mL.

Agua destilada_____35 mL.

Sobre un portaobjetos, y con la ayuda de una pipeta Pasteur desechable se distribuye el medio Berlese de forma que quede repartido homogéneamente y sin exceso de volumen. Los ejemplares se colocan de manera uniforme en dos líneas de 10 especímenes (20 ejemplares). Los últimos ajustes de las distintas estructuras de interés taxonómico se realizan con la ayuda de una aguja enmangada y un microscopio estereoscópico.

Una vez montadas, las distintas preparaciones se disponen en bandejas y se llevan a una estufa a 37°C hasta que la preparación esté seca, lo cual suele ocurrir en un periodo no inferior a una semana.

VI.1.3.c. Clasificación de los flebotomos.

Tras el montaje, los dípteros se clasifican atendiendo a sus características morfológicas. Dicha clasificación se realiza empleando un microscopio óptico y siguiendo las claves establecidas por diversos autores (véase apartado I.7.3. de la introducción).

VI.1.4. PERIODOS DE CAPTURA.

La puesta y recogida de los papeles adhesivos se ha realizado entre los meses de abril y octubre del año 2005. Estos meses coinciden con las estaciones del año en las que se concentra la mayor actividad de los flebotomos (Morillas-Márquez et al., 1983; Sanchis-Marín et al., 1986). Las trampas se colocaron mensualmente durante la segunda quincena de cada mes.

En las siguientes tablas se describen el número de trampas puestas y recogidas en las distintas fechas y puntos de muestreo:

<i>Provincia</i>	<i>Población</i>	<i>Fecha puesta</i>	<i>Nº trampas puestas</i>	<i>Fecha recogida</i>	<i>Nº trampas recogidas</i>
Almería	Rioja	13-04-05	13	28-04-05	12
	Tabernas	13-04-05	15	28-04-05	14
	Uleila del Campo	13-04-05	11	28-04-05	7
	Cobdar	13-04-05	10	28-04-05	10
	Albánchez	13-04-05	12	28-04-05	8
	Gallardos	13-04-05	11	28-04-05	6
	Promedio			12	
Granada	Haza Grande	14-04-05	14	27-04-05	14
	Loja	14-04-05	12	27-04-05	12
	Lanjarón	14-04-05	16	27-04-05	16
	Órgiva	14-04-05	8	27-04-05	7
	Torvizcón	14-04-05	16	27-04-05	15
	Sorvilán	14-04-05	14	27-04-05	14
	Albuñol	14-04-05	10	27-04-05	9
	Promedio			12,9	

Tabla 21. Fechas y número de trampas puestas y recogidas en abril.

<i>Provincia</i>	<i>Población</i>	<i>Fecha puesta</i>	<i>Nº trampas puestas</i>	<i>Fecha recogida</i>	<i>Nº trampas recogidas</i>
Almería	Rioja	13-05-05	14	20-05-05	14
	Tabernas	13-05-05	17	20-05-05	17
	Uleila del Campo	13-05-05	11	20-05-05	11
	Cobdar	13-05-05	11	20-05-05	11
	Albanchéz	13-05-05	10	20-05-05	8
	Gallardos	13-05-05	9	20-05-05	9
	Promedio			12	
Granada	Haza Grande	11-05-05	14	18-05-05	14
	Loja	11-05-05	12	18-05-05	11
	Lanjarón	11-05-05	16	18-05-05	16
	Órgiva	11-05-05	8	18-05-05	7
	Torvizcón	11-05-05	17	18-05-05	17
	Sorvilán	11-05-05	13	18-05-05	13
	Albuñol	11-05-05	10	18-05-05	10
	Promedio			12,9	

Tabla 22. Fechas y número de trampas puestas y recogidas en mayo.

<i>Provincia</i>	<i>Población</i>	<i>Fecha puesta</i>	<i>Nº trampas puestas</i>	<i>Fecha recogida</i>	<i>Nº trampas recogidas</i>
Almería	Rioja	17-06-05	13	24-06-05	13
	Tabernas	17-06-05	17	24-06-05	17
	Uleila del Campo	17-06-05	11	24-06-05	7
	Cobdar	17-06-05	11	24-06-05	11
	Albanchéz	17-06-05	10	24-06-05	10
	Gallardos	17-06-05	10	24-06-05	8
	Promedio			12	
Granada	Haza Grande	15-06-05	14	22-06-05	13
	Loja	15-06-05	12	22-06-05	11
	Lanjarón	15-06-05	16	22-06-05	16
	Órgiva	15-06-05	8	22-06-05	8
	Torvizcón	15-06-05	17	22-06-05	17
	Sorvilán	15-06-05	14	22-06-05	14
	Albuñol	15-06-05	10	22-06-05	10
	Promedio			13	

Tabla 23. Fechas y número de trampas puestas y recogidas en junio.

Los flebotomos

<i>Provincia</i>	<i>Población</i>	<i>Fecha puesta</i>	<i>Nº trampas puestas</i>	<i>Fecha recogida</i>	<i>Nº trampas recogidas</i>
Almería	Rioja	13-07-05	13	20-07-05	13
	Tabernas	13-07-05	17	20-07-05	17
	Uleila del Campo	13-07-05	11	20-07-05	11
	Cobdar	13-07-05	11	20-07-05	11
	Albánchez	13-07-05	11	20-07-05	11
	Gallardos	13-07-05	8	20-07-05	8
	Promedio			11,8	
Granada	Haza Grande	13-07-05	14	20-07-05	14
	Loja	13-07-05	12	20-07-05	12
	Lanjarón	13-07-05	15	20-07-05	15
	Órgiva	13-07-05	8	20-07-05	7
	Torvizcón	13-07-05	17	20-07-05	17
	Sorvilán	13-07-05	14	20-07-05	14
	Albuñol	13-07-05	10	20-07-05	10
	Promedio			12,9	

Tabla 24. Fechas y número de trampas puestas y recogidas en julio.

<i>Provincia</i>	<i>Población</i>	<i>Fecha puesta</i>	<i>Nº trampas puestas</i>	<i>Fecha recogida</i>	<i>Nº trampas recogidas</i>
Almería	Rioja	18-08-05	13	24-08-05	13
	Tabernas	18-08-05	16	24-08-05	15
	Uleila del Campo	18-08-05	11	24-08-05	11
	Cobdar	18-08-05	10	24-08-05	10
	Albánchez	18-08-05	9	24-08-05	9
	Gallardos	18-08-05	6	24-08-05	6
	Promedio			10,8	
Granada	Haza Grande	17-08-05	14	24-08-05	14
	Loja	17-08-05	12	24-08-05	12
	Lanjarón	17-08-05	15	24-08-05	14
	Órgiva	17-08-05	8	24-08-05	8
	Torvizcón	17-08-05	17	24-08-05	17
	Sorvilán	17-08-05	14	24-08-05	14
	Albuñol	17-08-05	10	24-08-05	8
	Promedio			12,9	

Tabla 25. Fechas y número de trampas puestas y recogidas en agosto.

<i>Provincia</i>	<i>Población</i>	<i>Fecha puesta</i>	<i>Nº trampas puestas</i>	<i>Fecha recogida</i>	<i>Nº trampas recogidas</i>
Almería	Rioja	14-09-05	13	21-09-05	13
	Tabernas	14-09-05	16	21-09-05	15
	Uleila del Campo	14-09-05	11	21-09-05	10
	Cobdar	14-09-05	10	21-09-05	10
	Albanchéz	14-09-05	10	21-09-05	9
	Gallardos	14-09-05	9	21-09-05	8
	Promedio			11,5	
Granada	Haza Grande	14-09-05	14	21-09-05	14
	Loja	14-09-05	12	21-09-05	12
	Lanjarón	14-09-05	15	21-09-05	15
	Órgiva	14-09-05	8	21-09-05	7
	Torvizcón	14-09-05	17	21-09-05	17
	Sorvilán	14-09-05	14	21-09-05	14
	Albuñol	14-09-05	10	21-09-05	10
	Promedio			12,9	

Tabla 26. Fechas y número de trampas puestas y recogidas en septiembre.

<i>Provincia</i>	<i>Población</i>	<i>Fecha puesta</i>	<i>Nº trampas puestas</i>	<i>Fecha recogida</i>	<i>Nº trampas recogidas</i>
Almería	Rioja	18-10-05	13	25-10-05	12
	Tabernas	18-10-05	16	25-10-05	14
	Uleila del Campo	18-10-05	11	25-10-05	11
	Cobdar	18-10-05	10	25-10-05	10
	Albanchéz	18-10-05	10	25-10-05	10
	Gallardos	18-10-05	9	25-10-05	8
	Promedio			11,5	
Granada	Haza Grande	13-10-05	14	20-10-05	14
	Loja	13-10-05	12	20-10-05	12
	Lanjarón	13-10-05	15	20-10-05	14
	Órgiva	13-10-05	8	20-10-05	8
	Torvizcón	13-10-05	17	20-10-05	17
	Sorvilán	13-10-05	14	20-10-05	14
	Albuñol	13-10-05	10	20-10-05	10
	Promedio			12,9	

Tabla 27. Fechas y número de trampas puestas y recogidas en octubre.

VI.1.5. DATOS DE TEMPERATURA EMPLEADOS EN EL ESTUDIO.

Las temperaturas utilizadas en el presente trabajo proceden de la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET), a través de su Centro Meteorológico Territorial de Andalucía Oriental y Melilla, y se obtuvieron mediante solicitud telemática.

Dado que la AEMET no dispone de estaciones meteorológicas en todas las poblaciones muestreadas se ha realizado una selección previa tomando aquellas estaciones que cumpliesen con los siguientes criterios:

1. Disponibilidad de los datos relativos a las temperaturas de los años 1978 y 2005 en la provincia de Granada.
2. Disponibilidad de los datos relativos a las temperaturas de los años 1982 y 2005 en la provincia de Almería.
3. Que las estaciones seleccionadas fuesen representativas de los matices bioclimáticos estudiados.

Con estas premisas se han escogido un total de 7 demarcaciones geográficas, 3 pertenecientes a la provincia de Almería (Níjar, Lubrín y Albox) y 4 a la provincia de Granada (Órgiva, Motril, Pinos Puente y Lanjarón). Los municipios de Níjar, Órgiva y Motril pertenecen al piso termomediterráneo, mientras que Lubrín, Albox, Pinos Puente y Lanjarón corresponden al mesomediterráneo.

Estos emplazamientos quedan geo-referenciados con las siguientes coordenadas geográficas y altitudes:

	Longitud	Latitud	Altitud
Níjar	2°12'17" W	36°58'00"N	356 m
Lubrín	2°03'57" W	37°12'50"N	500 m
Albox	2°08'52" W	37°23'20"N	420 m
Órgiva	3°25'27" W	36°54'00"N	450 m
Motril	3°31'17" W	36°45'10"N	40 m
Pinos Puente	3°54'02" W	37°10'45"N	580 m
Lanjarón	3°29'30" W	36°55'27"N	707 m

Los flebotomos

De este modo se han obtenido los valores medios mensuales de las temperaturas mínimas, máximas y medias registradas en las citadas localizaciones en los diferentes meses de muestreo (tablas 28 a 34):

		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	
Níjar	1982	T.Máx.	19,7	23,8	30,9	33,6	31,7	28,7	24,3
		T.Med.	15,0	18,3	24,8	26,6	25,8	23,3	18,9
		T.Mín.	10,3	12,7	18,6	19,5	19,9	18,0	13,4
	2005	T.Máx.	21,8	27,5	30,7	33,3	31,6	29,0	23,9
		T.Med.	16,6	21,0	25,1	27,1	26,1	24,0	16,7
		T.Mín.	11,4	14,6	19,6	21,0	20,6	17,7	14,9

Tabla 28. Temperaturas (°C) de la estación meteorológica de Níjar.

		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	
Lubrín	1982	T.Máx.	15,8	16,9	17,5	30,3	28,4	24,7	19,3
		T.Med.	11,4	12,4	12,8	23,0	20,9	17,7	14,2
		T.Mín.	7,1	7,9	8,2	15,7	13,5	10,6	9,1
	2005	T.Máx.	21,0	25,1	28,8	31,5	29,7	26,7	21,5
		T.Med.	15,5	18,9	22,8	25,3	24,4	21,4	17,0
		T.Mín.	9,9	12,6	16,9	19,2	19,1	16,2	12,5

Tabla 29. Temperaturas (°C) de la estación meteorológica de Lubrín.

		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	
Albox	1982	T.Máx.	21,3	25,4	32,5	36,2	33,4	30,1	26,1
		T.Med.	15,3	18,7	25,6	28,7	26,2	23,5	19,1
		T.Mín.	9,1	12,0	18,6	21,2	19,0	16,8	12,1
	2005	T.Máx.	25,5	30,1	33,5	36,5	35,0	32,0	27,2
		T.Med.	16,9	21,3	24,8	27,8	26,2	22,5	18,5
		T.Mín.	8,2	12,5	16,0	18,9	17,3	13,0	9,7

Tabla 30. Temperaturas (°C) de la estación meteorológica de Albox.

Los flebotomos

		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	
Órgiva	1978	T.Máx.	19,2	21,6	25,7	31,9	31,1	28,9	22,6
		T.Med.	14,1	16,5	20,0	25,4	24,9	22,8	17,0
		T.Mín.	9,1	11,3	14,3	19,0	18,7	16,6	11,4
	2005	T.Máx.	23,8	28,2	32,7	36,0	34,3	29,9	25,7
		T.Med.	16,5	20,7	24,9	28,2	26,7	22,6	19,1
		T.Mín.	9,1	13,2	17,2	20,5	19,2	15,3	12,5

Tabla 31. Temperaturas (°C) de la estación meteorológica de Órgiva.

		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	
Motril	1978	T.Máx.	20,6	23,2	28,3	29,2	29,1	28,0	24,1
		T.Med.	15,9	18,5	23,2	23,8	24,0	23,2	19,1
		T.Mín.	11,2	13,7	18,2	18,4	18,8	18,4	14,1
	2005	T.Máx.	21,9	25,5	27,7	29,8	29,4	26,1	24,2
		T.Med.	17,9	21,0	23,9	25,5	25,6	22,2	20,4
		T.Mín.	13,8	16,5	20,1	21,2	21,7	18,3	16,5

Tabla 32. Temperaturas (°C) de la estación meteorológica de Motril.

		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	
Pinos Puente	1978	T.Máx.	17,2	21,8	24,8	37,5	36,6	34,0	24,5
		T.Med.	11,7	14,9	18,5	26,7	26,3	24,0	16,7
		T.Mín.	6,2	8,0	12,2	15,8	15,9	13,9	8,9
	2005	T.Máx.	24,4	31,4	37,7	39,0	37,9	30,2	25,8
		T.Med.	15,8	22,2	27,4	29,1	28,0	22,1	18,7
		T.Mín.	7,2	13,1	17,0	19,1	18,2	13,9	11,6

Tabla 33. Temperaturas (°C) de la estación meteorológica de Pinos Puente.

		Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	
Lanjarón	1978	T.Máx.	16,6	19,3	22,5	30,2	29,1	27,0	21,4
		T.Med.	11,3	13,4	16,7	22,8	22,2	20,2	15,0
		T.Mín.	6,0	7,5	11,0	15,3	15,2	13,4	8,6
	2005	T.Máx.	20,4	23,8	27,9	30,5	29,2	25,8	21,9
		T.Med.	13,7	17,4	21,1	23,6	22,7	19,1	16,2
		T.Mín.	7,1	11,0	14,3	16,7	16,2	12,5	10,6

Tabla 34. Temperaturas de la estación meteorológica de Lanjarón.

VI.1.6. TRATAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

VI.1.6.a. Flebotomos.

Una vez clasificados, los dípteros se han contabilizado por estación de muestreo y mes, obteniéndose así valores totales por especie. Con estos datos iniciales, conociendo el número total de trampas recogidas y sus dimensiones, se ha calculado la **densidad** o número de ejemplares capturados por metro cuadrado de trampa.

A continuación hemos elaborado una serie de tablas siguiendo el modelo de la tabla 35 con los datos de cada estación de muestreo en primera instancia, por pisos bioclimáticos pertenecientes a una misma provincia en segundo lugar, y con los valores totales de cada una de las provincias estudiadas (Granada y Almería).

Los flebotomos

Especie	Abril		Mayo		Junio...	Septiembre		Octubre		TOTAL	
	Nº	Nº/m ²	Nº	Nº/m ²	Nº...	Nº	Nº/m ²	Nº	Nº/m ²	Nº	Nº/m ²
Sm											
Pp											
Pa											
Ppa											
Ps											
Pch											
Pal											
TOTAL											
	T _R	m ² _R	T _R	m ² _R	T _R ...	T _R	m ² _R	T _R	m ² _R	T _R	m ² _R

Tabla 35. Tabla resumen de clasificación elaborada para cada estación de muestreo. Nº=número de ejemplares; Nº/m²=número de ejemplares por metro cuadrado; Sm=*Sergentomyia minuta*; Pp=*Phlebotomus (P.) perniciosus*; Pa=*P. ariasi*; Ppa=*P. papatasi*; Ps=*P. sergenti*; Pch=*P. chabaudi*; Pal=*P. alexandri*; T_R=trampas recogidas; m²_R=metros cuadrados recogidos.

Estas tablas también se han diseñado con los datos obtenidos de los estudios efectuados en 1978 (Granada) y 1982 (Almería) para facilitar el posterior análisis comparativo.

Seguidamente se ha procedido a calcular las siguientes variables:

Abundancia o prevalencia: Porcentaje de una determinada especie respecto al total de capturas realizadas.

Frecuencia: Número de estaciones en las que se ha capturado una especie concreta respecto al total de estaciones.

Periodo de actividad: Periodo de tiempo en el cual una especie ha sido capturada. Se calcula determinando en cada mes de muestreo el número de estaciones en las que una especie dada se halla presente.

Estos parámetros se han calculado en función del matiz bioclimático, de la provincia, y del año.

En último lugar, se ha calculado la variación de las densidades de las distintas especies capturadas entre los años 1978 y 2005 en Granada y entre los

años 1982 y 2005 en Almería, expresando los resultados por pisos bioclimáticos y por provincia.

VI.1.6.b. Temperatura.

Para comparar la variación de las densidades de las distintas especies de flebotomos con los cambios de temperatura acontecidos entre los años 1978, 1982 y 2005 hemos utilizado las temperaturas medias de cada estación meteorológica. El motivo de esta selección es que los valores de las temperaturas máximas y mínimas no aportan ninguna información adicional sobre sus valores medios, al mismo tiempo que existe gran correlación entre ellos (Correlación de Pearson = 0,954) (Figuras 69 a 72).

A continuación se han calculado los valores medios de las temperaturas medias pertenecientes a las estaciones meteorológicas situadas en un mismo matiz bioclimático y una misma provincia en cada año, así como los valores medios de los distintos pisos bioclimáticos que constituyen cada provincia.

Posteriormente se ha calculado la variación de temperaturas entre los años 1978 y 2005 en la provincia de Granada, y entre 1982 y 2005 en la provincia de Almería, tanto por matices bioclimáticos como por provincias.

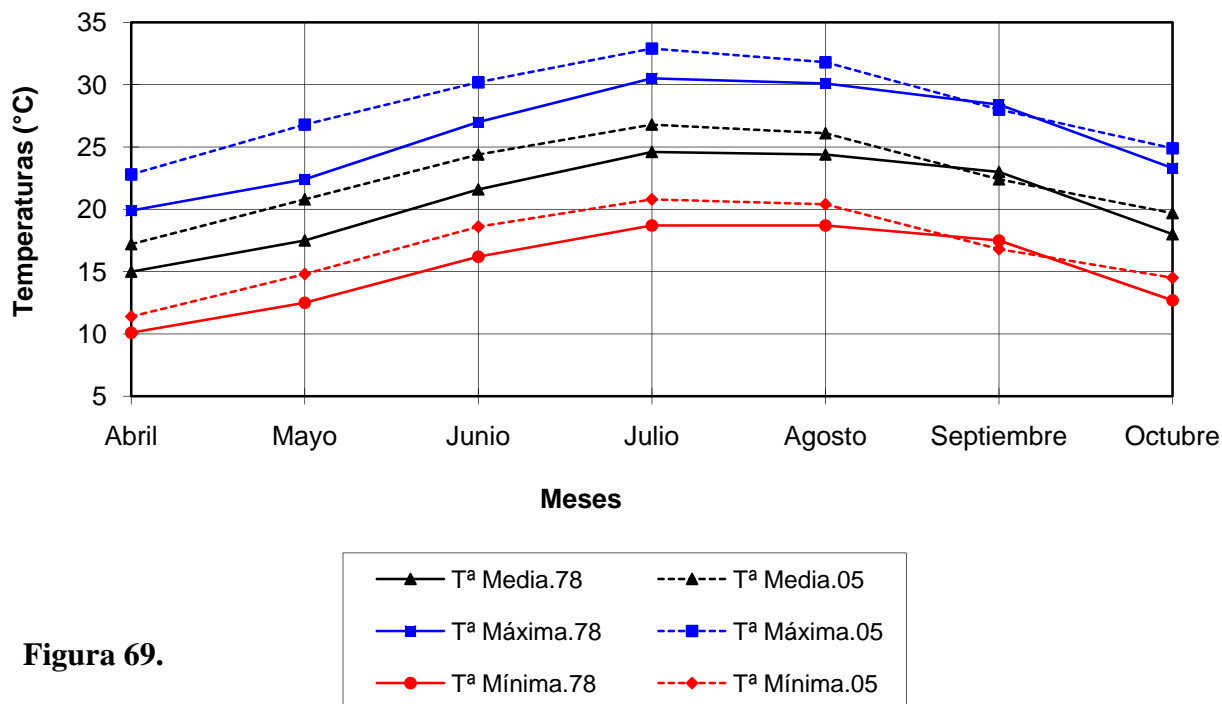


Figura 69.

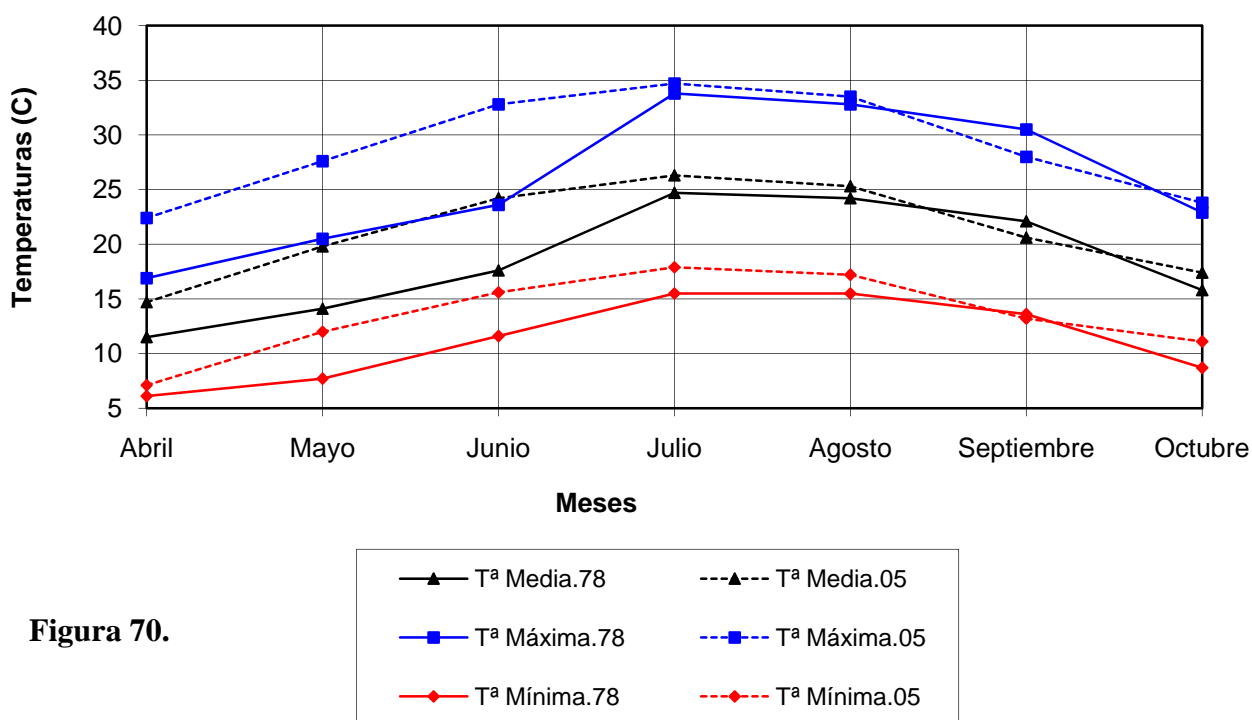


Figura 70.

Figuras 69 y 70. Evolución mensual de los valores medios de las temperaturas máximas, medias y mínimas de las estaciones meteorológicas pertenecientes a los pisos bioclimáticos termomediterráneo (69) y mesomediterráneo (70) de la provincia de Granada.

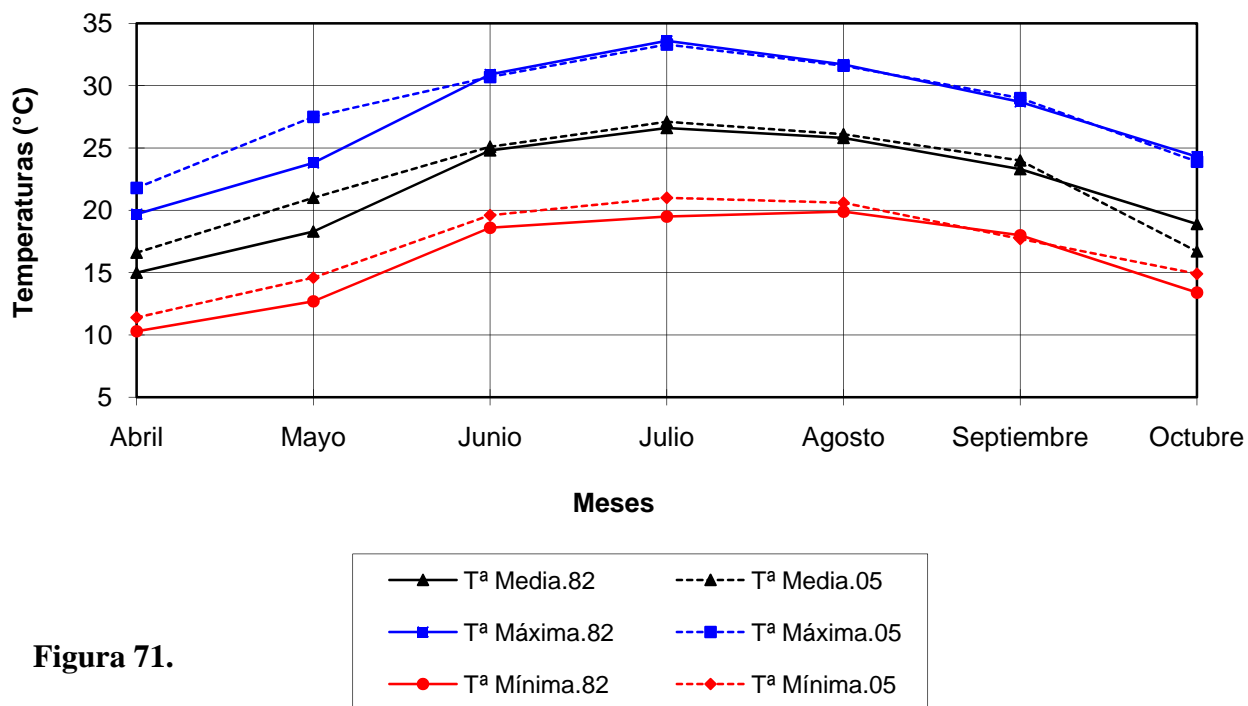


Figura 71.

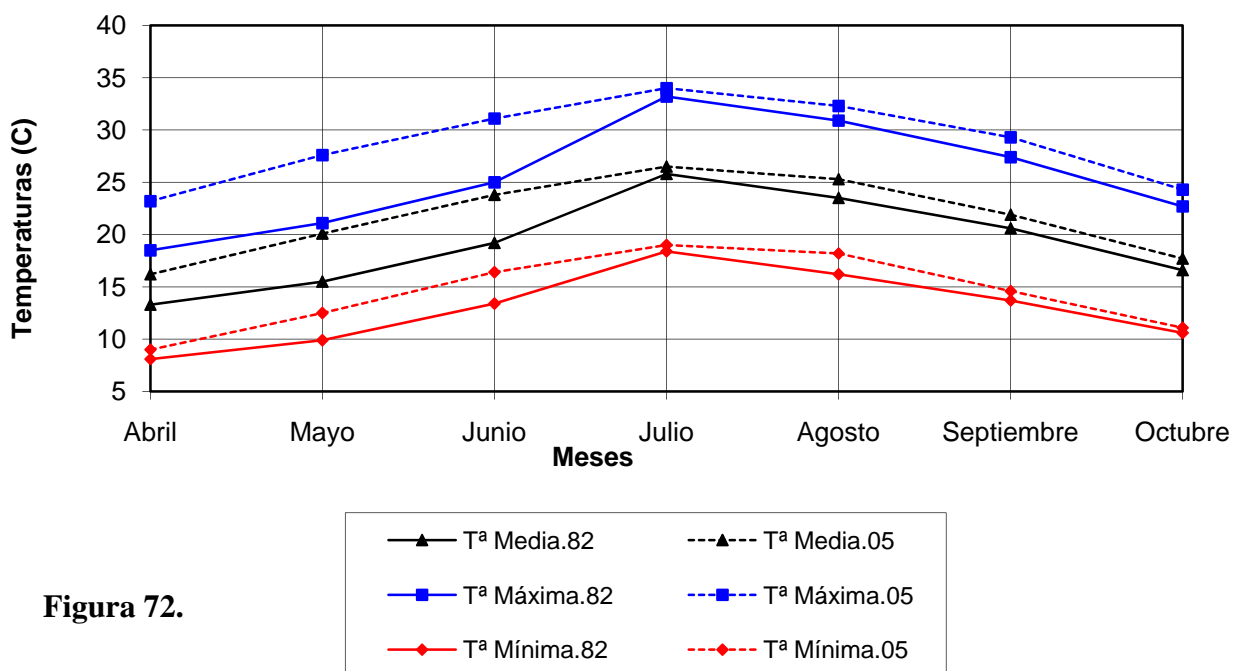


Figura 72.

Figuras 71 y 72. Evolución mensual de los valores medios de las temperaturas máximas, medias y mínimas de las estaciones meteorológicas pertenecientes a los pisos bioclimáticos termomediterráneo (71) y mesomediterráneo (72) de la provincia de Almería.

EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS

VI.2.1 . OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS.

La extracción de sangre (5 mL aprox.) se ha realizado a través de la vena cefálica, situada en la cara dorsal del antebrazo. Este método es rápido y sencillo. Se procede a colocar un compresor en la parte superior de la pata y se esteriliza la zona con un algodón impregnado en alcohol 70°. A continuación se inserta la aguja previa inmovilización de la vena mediante la sujeción de la piel por la parte posterior, y se extrae el volumen necesario de sangre retirando el compresor en caso de colapso de la vena.



Figura 73. Procedimiento de extracción de sangre.

La sangre extraída se dividió en dos fracciones, una para separar el suero por centrifugación (1500 r.p.m. durante 5 min.) y otra con EDTA como anticoagulante para el diagnóstico molecular. Ya en el laboratorio, esta segunda fracción ha sido alicuotada en volúmenes de 200 μ L. Todas las muestras fueron conservadas a -20°C hasta el momento de su análisis.

VI.2.2. FORMULARIO PARA LA ENCUESTA CANINA.

De forma paralela a la recogida de las muestras, a los propietarios de los perros se les ha realizado una encuesta donde se han tomado una serie de datos relativos a los propios animales, y a su nivel de conocimiento de la enfermedad y medidas preventivas empleadas, en caso de utilizarlas.

Este cuestionario, con título “Estudio de leishmaniosis canina”, fue elaborado para el proyecto EDEN (Emerging Diseases in a changing European eNvironment) y se muestra a continuación:

El diagnóstico de la leishmaniosis



EDEN- LEI – SPAIN

ESTUDIO DE LEISHMANIOSIS CANINA

Fecha:.....
.....

Nº de ficha:

Tipo de muestra:

- Suero Muestra
cutánea
 Sangre periférica
 Ganglio linfático
 Médula ósea

Prueba diagnóstica

- Microscopía ELISA
 Cultivo *in vitro* Otros
 IFI
 PCR

RESULTADO DEL DIAGNÓSTICO: Positivo Titulo: Negativo

Datos demográficos del perro: [Consultar la cartilla de vacunación si es posible]

Nombre:

Longitud del pelo Corto Medio Largo

Macho Hembra Edad Peso Raza

Procedencia: País Provincia..... Localidad

Lugar habitual donde vive el perro

Dirección: Localidad: Provincia:

Comunidad:

en casa en el exterior en perrera

Hábitat del lugar donde vive el perro:

urbano peri-urbano rural llanura colina montaña

Lugar donde pernocta el animal: exterior interior

Vive con otros perros: NO SI (Cuántos):

Aptitud del perro

Compañía Guarda Pastor Caza Perrera Vagabundo Otro

Traslados/viajes

NO SI en caso afirmativo, donde (localidad, provincia, comunidad autónoma, país)

.....

Periodo: mes/es, año/s.....

El diagnóstico de la leishmaniosis

Síntomas clínicos asociados a leishmaniosis canina

- NO
 SI: ganglios linfáticos inflamados dermatitis furfuracea alopecia úlceras
onicogrifosis epistaxis palidez de mucosas lesiones oculares esplenomegalia
pérdida de peso otros

Veterinario

Nombre y apellidos:
Dirección: Localidad:
Provincia: Código postal: Teléfono:

CUESTINARIO PARA EL PROPIETARIO DEL PERRO

Datos del propietario

Nombre y apellidos:
Dirección: Localidad:
Provincia: Código postal: Teléfono:

Conocimiento previo sobre la leishmaniosis

- ¿Ha oído hablar de la leishmaniosis visceral (LV)? NO SI
¿Qué riesgo cree que tendrá su perro de padecer leishmaniosis durante su vida?
 0% 5% 10% 20% 50% 50-90% 100%

Medidas preventivas

- ¿Conoce algún método para proteger a su perro de la picadura de los flebotomos? NO SI
En caso afirmativo, ¿ha utilizado algún método para proteger a su perro contra la LV? NO SI

En caso afirmativo, ¿cuál?

- Collar: Scalibor otro collar especificar marca:
Pipeta: Advantix ExSpot otra pipeta especificar marca:
Spray: Duowin otro spray especificar marca:
Champú: especificar marca:

El diagnóstico de la leishmaniosis

En caso negativo, ¿por qué no?

No he conseguido encontrarlos en las tiendas

Son muy caros

No creo que sean realmente eficaces

El riesgo de LV no es tan serio

Otros especificar:

Conocimiento de otros artrópodos picadores

¿Aplica algún insecticida a su perro para protegerle de picaduras de otros insectos o de garrapatas?

NO SI

En caso afirmativo, especificar método y marca:.....

Equipo de toma de muestras

.....
.....

VI.2.3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EMPLEADAS.

VI.2.3.a. Técnicas serológicas.

VI.2.3.a.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Se ha seguido el protocolo descrito por Acedo-Sánchez et al. (1993).

Preparación del antígeno:

Como antígeno hemos utilizado promastigotes completos de *Leishmania infantum* obtenidos de una cepa (MCAN/ES/90/DP204) aislada por punción ganglionar de un perro en la población de Jun (Granada), y tipificada mediante electroforesis de isoenzimas (zimodemo MON-1 = GR-1). Estos promastigotes se han mantenido en medio EMTM suplementado al 20% con suero bovino fetal.

Cuando los cultivos son ricos en promastigotes, se toman los sobrenadantes y se centrifugan durante 5 min. a 500 r.p.m. para eliminar los restos de agar.

A continuación se toma el sobrenadante y se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 5 min., se elimina el sobrenadante y con el botón obtenido se realizan los siguientes pasos:

- 1) Lavado en solución salina estéril de ClNa al 0,9% y centrifugación a 4000 r.p.m. durante 5 min. Se descarta el sobrenadante y se deja el botón.
- 2) Lavado en solución salina estéril de ClNa al 0,3% para lisar los glóbulos rojos, y centrifugación durante 5 min. a 4000 r.p.m. Descartar sobrenadante y dejar el botón.
- 3) Dos lavados sucesivos con solución salina estéril de ClNa 0,9%. De nuevo se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 5 min., descartando el sobrenadante y manteniendo el botón.

Al término de las centrifugaciones los botones son resuspendidos mediante agitación con vórtex.

El diagnóstico de la leishmaniosis

Una vez realizado el último lavado se rediluye el botón en solución salina estéril de ClNa al 0,9% y se realiza un recuento de los parásitos en la cámara de Neubauer, ajustando la concentración a $1,5 \times 10^6$ promastigotes/ mL.

Posteriormente se distribuye una gota de esta suspensión en cada uno de los pocillos de los portaobjetos IFI bien secos y desengrasados, y se dejan secar a temperatura ambiente. Por último se almacenan a -20°C .

Preparación y titulación de la antigamma-globulina:

Hemos utilizado una antigamma-globulina (conjugado) de perro, obtenida en conejo y marcada con isotiocianato de fluoresceína (Cultek, s.l.u.).

Para atenuar la autofluorescencia de fondo, todas las diluciones se han realizado con Azul de Evans como contracolorante, disuelto en tampón P.B.S.

Composición del tampón P.B.S.:

PO ₄ HNa ₂	2,7 gr
PO ₄ H ₂ K.....	0,4 gr
ClNa.....	8,5 gr
Agua destilada.....	1000 mL

Dilución del Azul de Evans:

Se prepara una dilución madre del Azul de Evans al 1/1000 en P.B.S. (conservada a 4°C).

Como diluyente del conjugado se emplea una dilución de Azul de Evans al 1/10000 preparada de forma extemporánea a partir de la dilución madre.

Titulación del conjugado:

Para saber a qué dilución debemos usar el conjugado se utilizan dos sueros controles, un suero negativo, y un suero positivo del que conocemos su título máximo. Se ensayan ambos sueros (el positivo hasta su título máximo) con distintas diluciones del conjugado, por encima y por debajo de la dilución orientativa que da el laboratorio fabricante.

El diagnóstico de la leishmaniosis

La dilución óptima es aquella con la que se obtiene la menor fluorescencia para el negativo, y a la vez se mantiene el positivo con el título máximo.

El conjugado finalmente usado es una dilución al 1/300 en Azul de Evans, al 1/10000 en P.B.S.

Realización de la técnica IFI:

1. Descongelar los portaobjetos con el antígeno a temperatura ambiente.
2. Fijar el antígeno introduciendo los portaobjetos en **acetona anhidra** durante 5 min. y dejar secar.
3. Realizar una primera dilución del suero problema a 1/20, y a partir de aquí se van haciendo las siguientes diluciones seriadas (1/40, 1/80, 1/160...) hasta la dilución deseada. Las diluciones de los sueros se realizan siempre con tampón **P.B.S.**, con la ayuda de pipetas automáticas y placas de microtitulación.
4. Depositar 25 μ L de las distintas diluciones sobre cada pocillo del portaobjetos IFI, incluyendo un control negativo y un control positivo (en su título máximo).
5. Incubar a 37°C en atmósfera húmeda durante 30 min.
6. Realizar tres lavados rápidos, y tres de 5 min. en agitación; cambiando el P.B.S. después de cada lavado.
7. Dejar secar el portaobjetos a temperatura ambiente y poner en cada pocillo una gota del **conjugado**.
8. Incubar de nuevo a 37°C durante 35 min. en atmósfera húmeda.
9. Repetir de nuevo los lavados y dejar secar a temperatura ambiente.
10. Colocar sobre cada pocillo una gota de **glicerina tamponada** (9 partes de glicerina/1 parte de P.B.S.) y cubrir con un cubreobjetos.

El diagnóstico de la leishmaniosis

11. Leer los resultados en el microscopio de fluorescencia. Una dilución se considera positiva cuando aparece fluorescencia verdosa continuada en toda la superficie del parásito (Fig. 74) y negativa cuando el antígeno se observa de color rojo (Fig. 75).

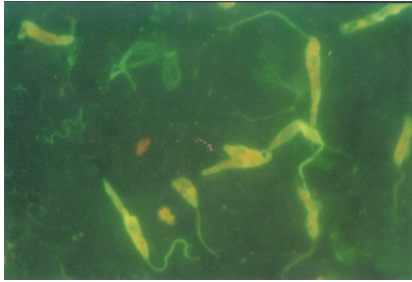


Figura 74. Suero positivo.

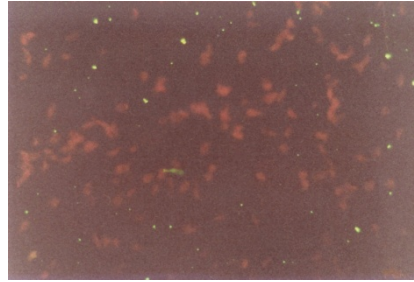


Figura 75. Suero negativo.

Una vez realizada la lectura se determina el título de anticuerpos del suero o dilución más alta en la cual se ha obtenido resultado positivo. En este caso el umbral de positividad se ha establecido en $\geq 1/160$, título a partir del cual se considera que el animal padece leishmaniosis y valor de referencia para la estimación de la prevalencia de la enfermedad en la zona de estudio. Este umbral ha sido fijado por Acedo-Sánchez (1993) de acuerdo con los trabajos realizados por Lanotte et al. (1974) y Ranque et al. (1978), entre otros. Los títulos < 20 se han calificado como negativos y aquellos comprendidos entre 20 y 80 (ambos inclusive) se han considerado dudosos.

VI.2.3.a.2. Kalazar Detect™ Canine Rapid Test (InBios International, Inc., USA).

Método inmunocromatográfico comercial basado en la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante el empleo de tiras reactivas impregnadas con proteína rK39 como antígeno de captura y proteína A unida a oro coloidal como conjugado.

Las tiras reactivas presentan una línea tapizada con antígeno recombinante rK39 en la zona de positividad y otra línea marcada con antiproteína A de pollo en la región de control de la reacción. Durante la reacción, la muestra de suero reacciona con el conjugado (proteína A-oro coloidal) precargado en la membrana y asciende por capilaridad hasta la banda con rK39, generando una línea roja en caso de presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* (positividad) o no apareciendo

marca alguna en caso de ausencia de los anticuerpos (negatividad). La muestra sigue migrando hasta llegar a la región marcada con anti-proteína A de pollo, la cual es el control positivo de reacción que siempre debe aparecer, dado que verifica la presencia de suficiente volumen de muestra, flujo de la misma, y actúa como control de los reactivos (información aportada por el fabricante).

Las tiras deben conservarse a temperatura ambiente (20-28°C), evitando temperaturas $\geq 30^\circ\text{C}$. De igual modo deben usarse antes de 1 hora después de haberlas sacado del envase para evitar sobre-exposición a la humedad. El kit contiene un envase con las tiras reactivas y otro conteniendo el tampón de carga.

Recomendaciones del fabricante sobre la muestra:

1. El kit sólo es válido para muestras de suero puro; no para sangre o suero diluido.
2. Evitar hemólisis durante la separación del suero.
3. El test debería realizarse tan pronto como se tome la muestra. Ésta debe mantenerse refrigerada entre 2 y 8°C durante no más de 3 días, y congelar para almacenaje.
4. Descongelar el suero antes de realizar el test, desaconsejándose congelaciones/descongelaciones del mismo.

Realización de la técnica Kalazar Detect™ Canine Rapid Test:

1. Descongelar previamente el suero dejándolo en la zona donde se realizará el ensayo.
2. Tomar una **tira reactiva** del embase.
3. Poner 20 μL de suero sin diluir en el área debajo de la flecha (Fig. 4).
4. Colocar la tira reactiva dentro de un tubo de ensayo o placa de microtitulación de 96 pocillos de forma que el final de la tira quede inclinado como indican las flechas de la misma.
5. Poner 2-3 gotas (100-150 μL) de **solución de carga**.

El diagnóstico de la leishmaniosis

6. Interpretar los resultados en 10 min. Es importante que el fondo esté limpio para leer el test, especialmente si tenemos títulos bajos de anticuerpos (sólo aparece una línea débil pero inequívoca). No deben interpretarse resultados con posterioridad a los 10 min.

Interpretación de los resultados:

Resultado positivo: tanto la línea control como la línea del test aparecen coloreadas. Una línea débil se considera resultado positivo y la intensidad de la misma varía según la concentración de anticuerpos anti-*Leishmania* presentes en el suero, aunque ésta no sea una técnica cuantitativa (Fig.76).

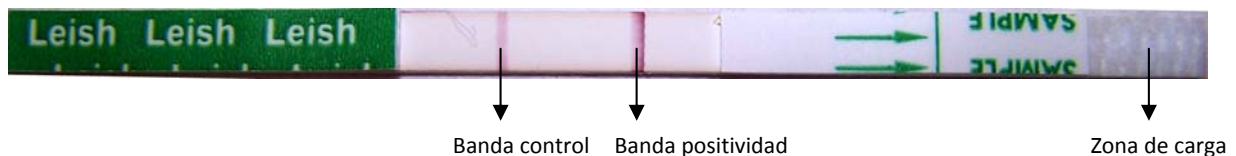


Figura 76. Tira reactiva mostrando resultado positivo.

Resultado negativo: sólo aparece coloreada la línea de control (Fig. 5).



Figura 77. Tira reactiva mostrando resultado negativo.

VI.2.3.a.3. Q Letitest ELISA Leishmania (Laboratorios Leti SA. España).

Kit de diagnóstico de leishmaniosis canina basado en la técnica ELISA, donde los pocillos de la placa de microtitulación han sido tapizados con proteína quimérica recombinante Q, obtenida a partir de un gen sintético que codifica para varios determinantes antigénicos presentes en diferentes antígenos de *L. infantum* (Soto M. et al., 1998).

El diagnóstico de la leishmaniosis

Conforme a la información distribuida con el producto este método consta de tres incubaciones. La primera pone en contacto a la proteína Q con los anticuerpos específicos de *Leishmania* (en caso de estar presentes); este complejo será reconocido en una segunda incubación por la proteína A, la cual se encuentra unida a la enzima peroxidasa, que a su vez, y en una tercera incubación en presencia del sustrato apropiado va a dar lugar a una coloración azulada. Finalmente la reacción se detiene con una solución de parada para proceder a la lectura espectrofotométrica de los resultados.

Todos los reactivos deben conservarse entre 2-8°C y sacarse unos 30 min. antes a la realización del ensayo para atemperarlos. Una vez abierta, la placa de microtitulación presenta una caducidad de 3 meses conservada entre 2-8°C, y en el envase donde se suministra. Una vez diluida, la solución de lavado tiene una caducidad de 4 meses conservada a 2-8°C.

Contenido del kit:

1. Placa de microtitulación de 96 pocillos tapizados con proteína Q inmovilizada.
2. Solución de lavado concentrada (20X).
3. Diluyente del suero.
4. Controles positivo y negativo. Deben manipularse como si fuesen muestras problema.
5. Proteína-A marcada con peroxidasa (Proteína A-PO).
6. Solución de sustrato (3,3'.5,5'-tetrametilbenzidina o TMB).
7. Solución de parada.

Todos los reactivos se encuentran listos para su uso, excepto la solución de lavado que debe agitarse y diluir hasta 1000 mL en agua destilada.

Realización de la técnica Q Letitest ELISA Leishmania:

1. Poner la sangre en tubos con EDTA y dejar 15 min. reposar o centrifugar (10 min. a 3000 r.p.m.).
2. Disponer sobre el soporte las tiras de pocillos que necesitemos, sin olvidar el blanco, control positivo y control negativo.

El diagnóstico de la leishmaniosis

3. Diluir previamente sueros problema y controles a 1:21 empleando el **diluyente** proporcionado por el kit. El blanco sólo lleva el diluyente. En cada pocillo se disponen 100 µL de dilución (según el fabricante estas diluciones se podrían realizar directamente en los pocillos poniendo 100 µL de diluyente seguidos de 5 µL de suero problema o control. Sellar los pocillos con la lámina autoadhesiva e incubar 30 min. a 37°C en agitación.
4. Primer lavado: Retirar lámina adhesiva y eliminar el contenido de cada pocillo, lavando cada uno de ellos 5 veces con 300 µL de **solución de lavado**. Finalmente vaciar por completo los pocillos.
5. Poner 100 µL de **proteína A-PO** por pocillo salvo aquel que tenga el blanco. Sellar los pocillos con lámina autoadhesiva e incubar 30 min. a 37°C en agitación.
6. Segundo lavado: Repetir proceso del paso 4.
7. Poner 100 µL de **solución sustrato** por pocillo en todos los pocillos. Incubar 30 min. a 37°C en agitación y oscuridad. Durante este proceso aparece la coloración azulada proporcional al nivel de anticuerpos presentes.
8. Detener la reacción poniendo 50 µL de **solución de parada**. Tanto en los sueros problema positivos como en el control positivo se observará un viraje de azul a amarillo.
9. Lectura de los resultados en espectrofotómetro con longitud de onda 450 nm.

Interpretación de los resultados:

Los valores de densidad óptica (D.O.) de los controles positivos y negativos deben estar dentro de los siguientes intervalos (en caso contrario repetir el ensayo):

DO_{450} Control negativo > 0,100

DO_{450} Control positivo > 0,800

El diagnóstico de la leishmaniosis

Para el cálculo e interpretación de resultados se debe dividir la D.O. del suero problema entre la D.O. del control positivo y el ratio obtenido se interpreta con la ayuda de la siguiente tabla:

Intervalo	Diagnóstico	Clase
RATIO: $\leq 0,35$	Negativo	Clase 0
RATIO: entre 0,35 y 0,40	Dudoso	Clase 1
RATIO: entre 0,41 y 0,50; ambos incluidos	Positivo	Clase 2
RATIO: $>0,51$	Positivo	Clase 3

Tabla 36. Interpretación de resultados obtenidos con la técnica QLE. Clase 0= Animal claramente negativo a leishmaniosis canina; Clase 1= Animal con cierto nivel de anticuerpos no claramente atribuibles a leishmaniosis canina activa. Se recomienda repetir ensayo en 30-60 días; Clase 2= Animal con leishmaniosis canina; Clase 3= Animal con leishmaniosis canina compatible con daño patológico orgánico (datos obtenidos del prospecto contenido en el kit de diagnóstico).

Nota 1 del fabricante: los resultados dudosos podrían deberse a casos de enfermedad sub-clínica; enfermedad en tratamiento; estadios iniciales de la enfermedad, o reacciones inespecíficas esporádicas ocasionadas por elevados niveles de lípidos, alta turbidez o contaminación bacteriana.

Nota 2 del fabricante: la proteína Q es un indicador de patología y de infección latente en animales que padecerán la enfermedad clínica de un modo más o menos intenso, discriminando aquellos animales que sólo han entrado en contacto con el parásito o no van a desarrollar la enfermedad en un tiempo prudencial.

VI.2.3.b. Técnicas moleculares.

VI.2.3.b.1. PCR-ELISA específica de *Leishmania infantum*.

Método de diagnóstico molecular basado en la detección específica de un fragmento de ADN del kinetoplasto (kADN) de *Leishmania infantum*. Este procedimiento consta de varias fases descritas por Martín Sánchez et al. (2001):

- a) Extracción del ADN a partir de las muestras de sangre completa periférica.
- b) Amplificación del fragmento de kADN.
- c) Hibridación del amplificado con una sonda oligonucleótida específica que permite su captura.
- d) Detección del amplificado capturado con una técnica de ELISA.

Extracción del ADN:

El ADN genómico se preparó a partir de 200 µL de sangre completa tratada con EDTA, empleando el Kit Extracción DNA SSS de REAL, Durviz s.l.u.

El kit consta de los siguientes reactivos:

1. Solución selectiva para la lisis de los glóbulos rojos.
2. Solución de lisis celular o detergente aniónico para el solubilizado de los componentes celulares.
3. Solución de precipitación proteica para la precipitación salina de proteínas citoplasmáticas y nucleares.

Las extracciones se realizaron en grupos de 7 muestras, y en cada grupo de extracción se incluyó un control negativo de extracción o tubo vacío que fue manipulado de la misma forma que las 7 muestras problema.

Procedimiento de extracción con el Kit Extracción DNA SSS de REAL:

A. Lisis celular

1. Añadir 200 µL de sangre a un microtubo con 600 µL de **solución de lisis de glóbulos rojos**. Se mezcla brevemente con vórtex e incuba durante 10

El diagnóstico de la leishmaniosis

- min. a temperatura ambiente (durante esta incubación invertir el tubo varias veces).
2. Centrifugar 20-30 segundos a 13000-16000 r.p.m. Eliminar el sobrenadante con la micropipeta evitando tocar el botón formado y dejando un volumen residual de 10-20 μ L.
 3. Agitar con vórtex para resuspender el botón.
 4. Los pasos 1, 2 y 3 deben repetirse dos o más veces según el contenido en hemoglobina de la muestra, apreciable por la coloración rojiza que le confiere.
 5. Añadir 200 μ L de **solución de lisis celular** y resuspender con pipeta para lisar las células. Si la solución no se presenta homogénea debe incubarse a 37°C durante 10 min. o hasta que la solución se homogenice.

B. Precipitación proteica

1. Dejar que la muestra se atempere.
2. Añadir 120 μ L de **solución de precipitación proteica** al lisado celular obtenido en la fase anterior.
3. Agitar con vórtex a máxima velocidad durante 20-30 segundos.
4. Centrifugar a 13000-16000 r.p.m. durante 5 min. Aparece un precipitado marrón oscuro (si se observan partículas flotando en el sobrenadante, volver a centrifugar después de incubar 5 min. en hielo).

C. Precipitación del ADN

1. Pasar el sobrenadante a un nuevo microtubo con 200 μ L de **isopropanol**.
2. Mezclar por inversión 50 veces.
3. Centrifugar a 13000-16000 r.p.m. durante 2 min. (el ADN se observa como un botón blanco).
4. Eliminar el sobrenadante y secar el tubo apoyándolo de forma breve sobre papel absorbente. Añadir 200 μ L de **etanol 70%** e invertir suavemente.

El diagnóstico de la leishmaniosis

5. Centrifugar a 13000-16000 r.p.m. durante 1 min. Eliminar el sobrenadante por volteo y volver a eliminar el volumen residual con papel absorbente.
6. Dejar secar 15 min. a 37°C o durante 24 horas a temperatura ambiente.

D. Hidratación del ADN

1. Añadir 20 µL de **agua estéril para inyectables** y resuspender con pipeta.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora con agitaciones periódicas para ayudar a la dispersión del ADN, o incubar durante la noche a temperatura ambiente con ligera agitación.
3. Conservar a -20°C durante periodos prolongados de tiempo.

Amplificación del fragmento de kADN:

Los cebadores utilizados para la amplificación, 9 (forward) y 83 (reverse) amplifican un fragmento de 75 pares de bases perteneciente a la región del minicírculo del kADN de *L. infantum*, contenido en otro fragmento de mayor tamaño (196 pares de bases). En estudios anteriores realizados por Gramiccia et al. (1992) dicho fragmento había mostrado ser un buen candidato para el diagnóstico de esta especie, por revelar variabilidad interespecífica.

9 (forward) = 5'-CAAAGTCCCCACCAATCCC-3'

83 (reverse) = 5'-AAACCCTGGTCTGGAGGCTTAG-3'

Los restantes reactivos empleados han sido proporcionados por Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania) mediante el kit comercial "PCR-ELISA DIG Labeling":

El diagnóstico de la leishmaniosis

Denominación	Composición
Tampón 10X	KCl 50 nM, Tris-HCl 10 nM
Labelling Mix	Mezcla de los siguientes desoxi-ribonucleótidos (dNTPs): 2 mM de desoxiadenosín trifosfato (dATP) 2 mM de desoxicitidín trifosfato (dCTP) 2 mM de desoxiguanosín trifosfato (dGTP) 1,9 mM de desoxitimidín trifosfato (dTTP) 0,1 mM de desoxiuridín trifosfato (dUTP) marcado con digoxigenina.
Taq -polimerasa	Enzima ADN Taq-polimerasa (5 U/ μ L)

Procedimiento de Amplificación:

1. Preparar 24 tubos Eppendorf de 0,2 mL numerados del 1 al 24. Los tubos 1, 2 y 24 son para los controles negativo de PCR (sin ADN), negativo de extracción y positivo de PCR (ADN de *Leishmania infantum* a la concentración de 1000 parásitos/ μ L) respectivamente.
2. Poner **agua bidestilada estéril** en los tubos hasta completar un volumen final de 25 μ L. Considerando que se han puesto 1, 1 y 2 μ L de ADN por muestra se deben adicionar 18,5 μ L en el tubo 1 (sin ADN), 17,5 μ L en los tubos con 1 μ L de ADN (incluyendo control negativo de extracción y positivo de PCR) y 16,5 μ L en los tubos con 2 μ L de ADN.
3. Añadir 2,5 μ L de **tampón 10X** en cada tubo.
4. Añadir 2,5 μ L de **Labelling Mix** en cada tubo.
5. Añadir 0,5 μ L de cada uno de los **cebadores** (25 pM/ μ L) en cada tubo.
6. Los reactivos de los puntos 3, 4 y 5 se preparan conjuntamente y se pone en cada tubo de reacción 6 μ L de la mezcla.

El diagnóstico de la leishmaniosis

7. Añadir 0,5 µL de **Taq-polimerasa** en cada tubo (previamente diluida mezclando 1 parte de Taq-polimerasa por cada 3 partes de agua).
8. Adicionar a los tubos los volúmenes mencionados del **ADN** extraído e introducir en el termociclador.

Utilizamos un termociclador Techne (PROGENE) donde se ha programado el siguiente perfil térmico: primer ciclo de 94°C durante 3 min., 40 ciclos de amplificación (94°C durante 30s; 60°C durante 30s; 72°C durante 30s) y un ciclo final de extensión a 72°C durante 2min.

Hibridación del amplificado con una sonda específica y detección por ELISA:

Esta última fase del proceso de diagnóstico comienza con la hibridación de la secuencia amplificada con una sonda oligonucleotida específica 5'-CCA AAC AGG GCA AAA ACC-3' ($T_m = 53,7^\circ\text{C}$ y %G+C = 50) marcada en 5' con biotina. Esta biotina constituye el punto de anclaje con la placa de microtitulación a través de la estreptavidina que se encuentra tapizándola por completo, permitiendo el posterior desarrollo de la técnica ELISA.

Al igual que en el caso de la amplificación los reactivos necesarios se encuentran comercializados por Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania) bajo la denominación "PCR-ELISA DIG Detection".

Procedimiento para la Hibridación-ELISA:

1. Preparar un tubo Eppendorf de 1,5 mL por cada tubo de PCR repitiendo la numeración.
2. Poner a cada tubo 20 µL de **solución desnaturalizante** y adicionar los 25 µL del amplificado por PCR, cuidando de cambiar las puntas de pipeta. Agitar con vórtex y dar vuelta de centrifuga.
3. Incubar durante 10 min. a T^a ambiente.
4. Adicionar 205 µL de **solución de hibridación**, que se prepara con los siguientes volúmenes: la proporción debe ser de 10 µL de **sonda oligonucleótida específica de *L. infantum*** (0,77 pM/ µL) + 990 µL de

El diagnóstico de la leishmaniosis

tampón de hibridación. Para las 24 muestras multiplicar por 5 estos volúmenes (5 mL de la mezcla).

5. Agitar con vórtex y vuelta de centrífuga.
6. Pasar el volumen total de cada tubo Eppendorf (250 μ L) a cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación e incubar a 50°C durante 1-3 horas en agitación, cubriendo previamente con papel transparente autoadhesivo.
7. Durante este tiempo preparar los reactivos que se utilizarán en los siguientes pasos:

Solución de lavado: disolver un comprimido de tampón de lavado en 2 litros de agua bidestilada (solución estable a 4°C durante al menos 6 semanas).

Solución de anticuerpo antiDIG: cada muestra debe llevar 198 μ L de tampón de dilución del conjugado + 2 μ L de **solución anti-Digoxigenina-Peroxidasa** (conjugado) que se debe reconstituir como sigue; 250 μ L de agua estéril para inyectables en tubo de la anti-digoxigenina-peroxidasa (mezclar durante 15 min. lentamente a temperatura ambiente). Duración aproximada de 2 meses conservada a temperatura de 2 a 8 °C. Estos volúmenes deben multiplicarse por las 24 muestras.

Solución de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)): disolver un comprimido de ABTS en 5 mL de tampón sustrato. Debe conservarse tapado con papel de aluminio por ser fotosensible.

8. Descartar la solución. Lavar cada pocillo usando 250 μ L de solución de lavado durante 5 min. a 37°C y en oscilación. Lavar 3 veces.
9. Adicionar 195 μ L de **solución de anticuerpo antiDIG** por pocillo. Se deja incubar a 37°C durante 30 min. en vibración.
10. Descartar la solución y lavar 3 veces de igual forma que en el punto 8.
11. Adicionar 200 μ L de **solución ABTS** e incubar 40 min. a 37°C en vibración cubierto con papel de aluminio.

12. Leer los resultados en el espectrofotómetro a 405 nm. El blanco de reacción es un pocillo de la placa que sólo contiene ABTS.

Interpretación de los resultados:

Las muestras se han considerado positivas cuando los valores de absorbancia obtenidos han sido $\geq 1,0$. Cuando la densidad óptica está entre 0,5 y < 1 ; se procede a repetir la amplificación utilizando 2, 3 y 4 μL de ADN.

VI.2.3.b.2. Diseño de una técnica de PCR a tiempo real a partir de una PCR-ELISA específica de *L. infantum*.

Condiciones generales de reacción:

Se ha utilizado un dispositivo de PCR en tiempo real MX3000P de Stratagene®.

Según las indicaciones del fabricante cada reacción debe contener:

1. 12,5 μL de Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene®) ó de Brilliant® II QPCR Master Mix (Stratagene®). Ambos reactivos se presentan a concentración 10X.
2. X μL de cebador "a" (optimizar).
3. X μL de cebador "b" (optimizar).
4. X μL de sonda Taqman® (optimizar) (Sólo cuando se utiliza Brilliant® II QPCR Master Mix de Stratagene® 10X).
5. Agua bidestilada estéril hasta alcanzar un volumen final de reacción = 25 μL .

El perfil térmico programado ha incluido un primer ciclo con incubación a 95°C durante 10min., y 36 ciclos de amplificación de 95°C durante 30s y 60°C durante 1min. Para optimizar las concentraciones de cebadores, y siempre que se utilice SYBR® Green como fluoróforo, se incluye un ciclo final de disociación de 95°C durante 1min., 65°C durante 30s y 95°C durante 30s.

Optimización de las concentraciones de cebadores:

Se han empleado los mismos cebadores que en el apartado anterior (PCR-ELISA específica de *L. infantum*), y las concentraciones de éstos se han ajustado a las nuevas condiciones de reacción. Para ello se ha utilizado SYBR Green (Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix 10X de Stratagene®, Agilent Technologies) como química de detección. Se trata de un fluoróforo inespecífico, que se une indistintamente tanto al producto pretendido como a los dímeros de cebadores, entre otros productos inespecíficos. Cuando está intercalado dentro de la doble hélice del ADN se encuentra en estado activado, y emite fluorescencia. Dado que cada uno de estos fragmentos presenta una temperatura de fusión (T_m) propia, el análisis de la disminución de la fluorescencia emitida por el SYBR® Green con la temperatura permitirá diferenciar los amplificadores específicos de los productos no deseados.

Se ha construido una batería de reacciones para identificar las concentraciones de cebadores que permitiesen amplificar 2 alícuotas de 1 μL de ADN de *L. infantum* equivalentes a 31 y 3,8 parásitos/ μL . Ambas concentraciones de parásitos se han seleccionado en ensayos previos por ser el rango en el que se han detectado mayor número de inespecificidades en la amplificación. De este modo, las primeras concentraciones de cebadores ensayadas han sido 100 nM de forward (F) y 400 nM de reverse (R), que se modificaron de 25 nM en 25 nM - incrementando en el caso del F y disminuyendo en el caso del R- hasta llegar a 400 nM de F y 100 nM de R. Las concentraciones de los restantes reactivos se han mantenido constantes y cada muestra se ha realizado por duplicado.

Los mejores resultados en esta selección previa se obtuvieron con 125 nM (F) y 375 nM (R), y 150 nM (F) y 350 nM (R).

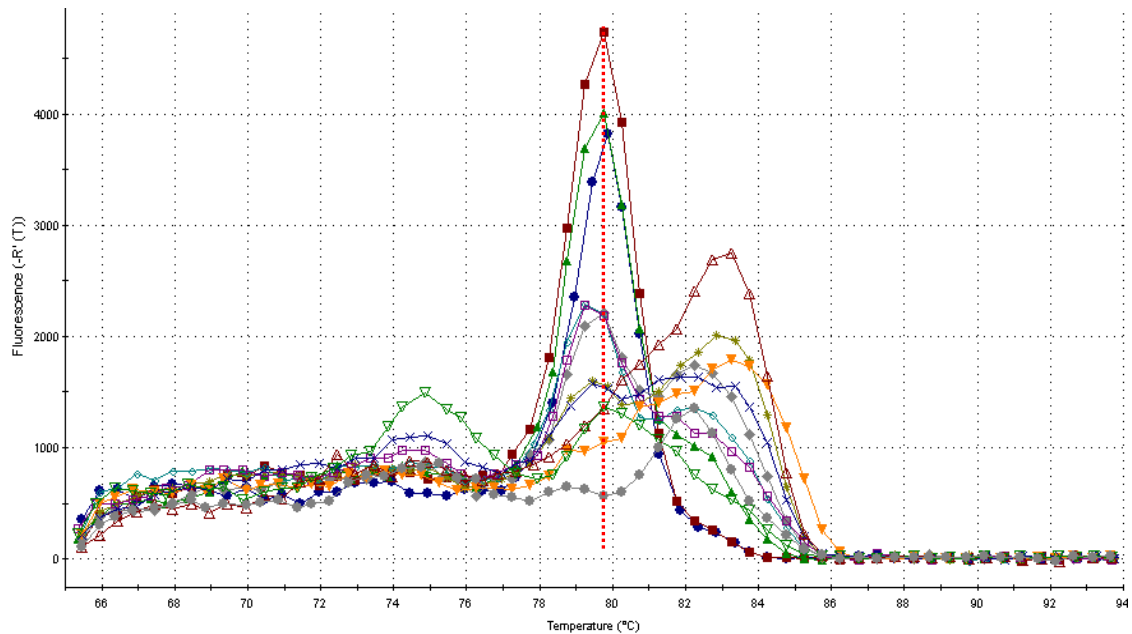


Figura 78. Curvas de disociación obtenidas con las distintas concentraciones de cebadores ensayadas. Reacciones realizadas con ADN de *L. infantum* equivalente a 31 y 3,8 parásitos/ μL (2 replicados por concentración). Temperatura de fusión (T_m) de fragmento específico de *L. infantum* = $79,3^\circ\text{C}$ (línea discontinua roja). Los restantes picos corresponden a productos inespecíficos de amplificación.

A continuación se realizaron dos grupos de reacciones (Fig. 79) para analizar el comportamiento de ambas concentraciones de cebadores frente a un rango mayor de concentraciones de parásitos. Para ello se han utilizado 14 concentraciones decrecientes de parásitos obtenidas por dilución seriada a partir de $1 \mu\text{L}$ de ADN equivalente a 1000 parásitos, hasta llegar a un dilución mínima de 0,15 parásitos. Cada dilución se realizó por triplicado y se incluyeron tres controles negativos de PCR.

En esta segunda fase los mejores resultados se obtuvieron con 150 nM del cebador 9 (F) y 350 nM del cebador 83 (R), y para asegurar la reproducibilidad de los resultados el ensayo se repitió dos veces. Finalmente éstas han sido las concentraciones mantenidas.

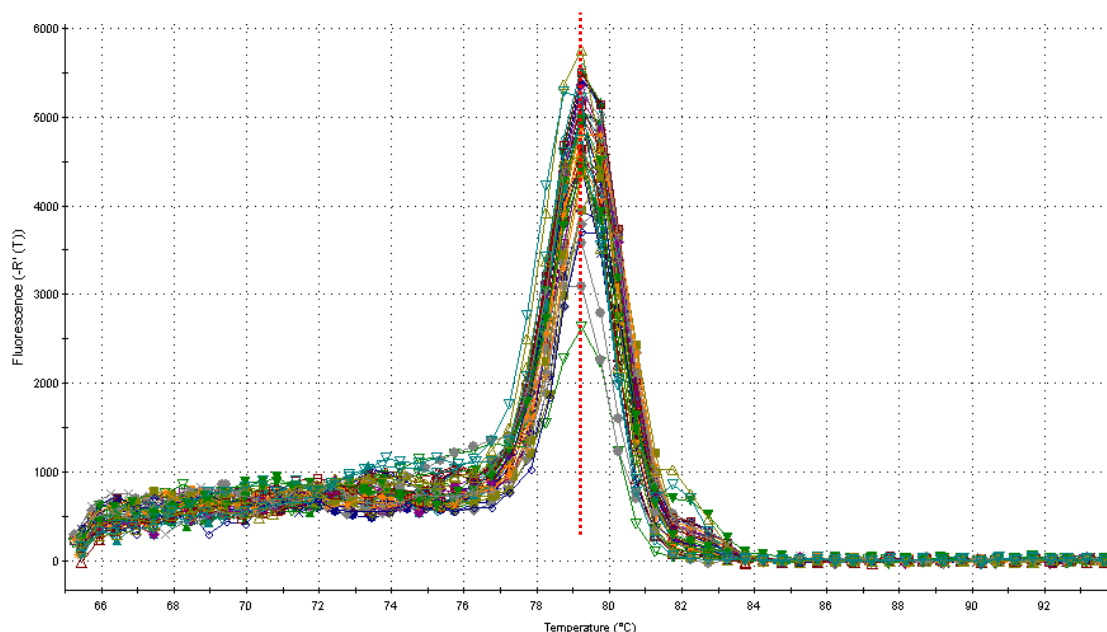


Figura 79. Curvas de disociación obtenidas con los dos pares de concentraciones de cebadores seleccionados. Se han utilizado 14 concentraciones de parásitos situadas entre 1000 y 0,15 parásitos/ μL de ADN (3 replicados por concentración). Temperatura de fusión (T_m) de fragmento específico de *L. infantum* = 79,3°C (línea discontinua roja).

Optimización de la concentración de sonda:

Una vez conocidas las concentraciones óptimas de cebadores se ha procedido a sustituir el reactivo SYBR Green por una sonda de hibridación específica o sonda TaqMan[®], y Brilliant[®] II QPCR Master Mix (Stratagene[®]) como fuente de desoxi-ribonucleótidos. Esta sonda se encuentra marcada en 5' con un fluoróforo donador (FAM) y en 3' con un aceptor (TAMRA), que absorbe la fluorescencia emitida por el agente fluorescente cuando ambos se encuentran próximos (unidos por la sonda específica), siendo su secuencia la siguiente: FAM-CCA-AAC-AGG-GCA-AAA-ACC-CCA-AAA-TGA-AGA-TAMRA. Durante la amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa hidroliza la sonda gracias a su acción desoxirribonucleasa, y el fluoróforo es liberado al medio, emitiendo la fluorescencia que será detectada por el dispositivo de PCR en tiempo real. La mayor ventaja que confieren estos marcadores es la especificidad que aporta la propia sonda.

La cantidad óptima de sonda TaqMan[®] se seleccionó entre 6 concentraciones (50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM y 300 nM), las cuales se ensayaron con 3 alícuotas de 1 μL de ADN de *L. infantum* equivalentes a 125;

El diagnóstico de la leishmaniosis

7,7 y 0,3 parásitos/ μL (Fig. 80). Las concentraciones de los restantes reactivos se mantuvieron constantes y cada muestra se realizó por duplicado.

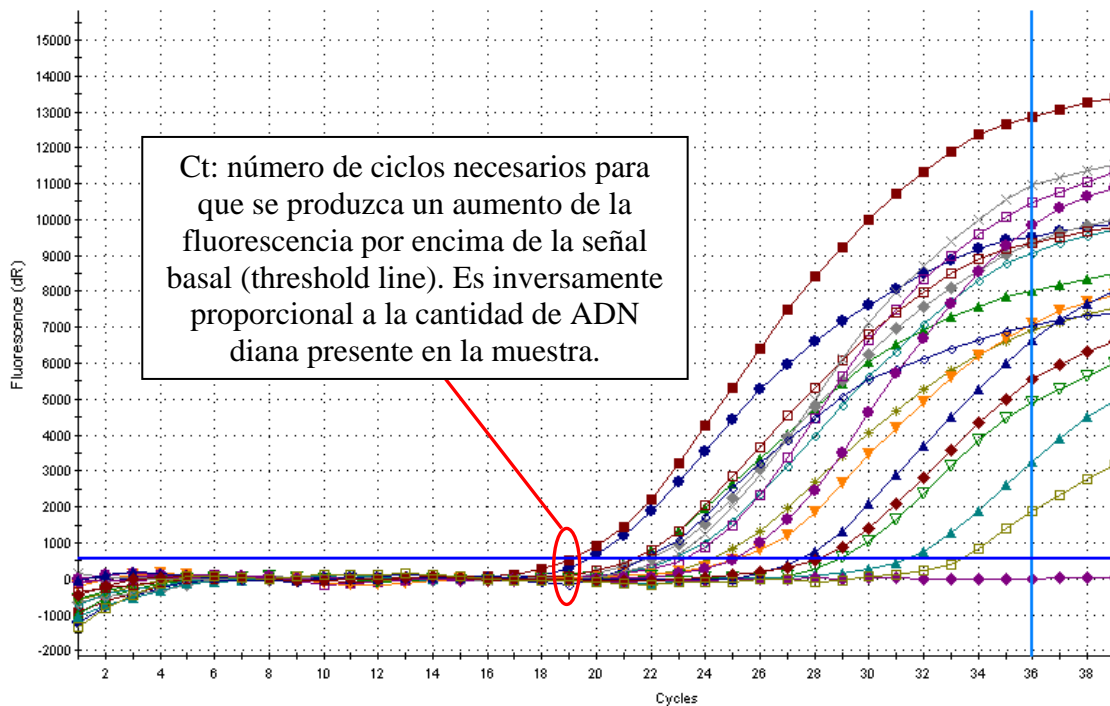


Figura 80. Curvas de amplificación obtenidas con las 6 concentraciones de sonda TaqMan® ensayadas. Se utilizó ADN equivalente a 125; 7,7 y 0,3 parásitos/ μL (3 replicados por concentración).

Se ha decidido utilizar la sonda TaqMan® a concentración 100 nM por ofrecer mayor sensibilidad/especificidad de resultados, y al igual que en el apartado anterior se procedió a realizar una nueva batería de reacciones con 14 concentraciones decrecientes de parásitos obtenidas por dilución seriada a partir de una alícuota de ADN equivalente a 1000 parásitos/ μL , hasta llegar a un dilución mínima de 0,15 parásitos/ μL . Cada concentración se analizó por triplicado y se incluyeron tres controles negativos de PCR. Este ensayo se realizó por triplicado.

Extracción del ADN:

Se ha seguido el mismo protocolo que en el apartado anterior (PCR-ELISA específica de *L. infantum*).

Procedimiento de amplificación con PCR en tiempo real:

1. Preparar 40 tubos de 0,2 mL (tubos con calidad PCR adaptados para ser acoplados al dispositivo de carga de muestras del aparato de PCR en tiempo real). Los tubos 1-2, 3-4, 35-37 y 38-40 son para los controles negativos de PCR (sin ADN), negativos de extracción y dos positivos de PCR (ADN de *Leishmania infantum* a las concentraciones de 125 y 7,8 parásitos/ μ L) respectivamente.
2. Poner **agua bidestilada estéril** en los tubos calculando las cantidades necesarias para que el volumen final sea de 25 μ L. Considerando que se pondrán 1, 1 y 2 μ L de ADN por muestra se deben adicionar 11 μ L de agua en los tubos 1 y 2 (sin ADN), 10 μ L en los tubos con 1 μ L de ADN (incluyendo controles negativos de extracción y positivos de PCR) y 9 μ L en los tubos con 2 μ L de ADN.
3. Añadir 12,5 μ L de **Brilliant[®] II QPCR Master Mix 10X (Stratagene[®])** en cada tubo.
4. Añadir 0,38 μ L del cebador "9" 150 nM (**forward**) en cada tubo.
5. Añadir 0,88 μ L del cebador "83" 350 nM (**reverse**) en cada tubo.
6. Añadir 0,25 μ L de **sonda TaqMan** 100 nM en cada tubo.
7. Los reactivos de los puntos 3, 4, 5 y 6 se preparan conjuntamente y se pone en cada tubo de reacción 14 μ L de la mezcla.
8. Adicionar a los tubos los volúmenes mencionados del **ADN** extraído y proceder con la amplificación y detección del producto amplificado.

La reacción se ha llevado a cabo en un equipo MX3000P de Stratagene[®], donde se ha programado un perfil térmico que incluye un primer ciclo de 95°C durante 10min, y 36 ciclos de amplificación de 95°C durante 30s y 60°C durante 1min.

Diseño de la curva estándar:

Para construir la curva estándar se han utilizado 8 diluciones de ADN equivalentes a 1000; 500; 250; 62,5; 15,6; 3,9; 0,9 y 0,09 parásitos/ μ L usando 4 replicados de cada concentración. Estas concentraciones se obtuvieron mediante dilución seriada de una concentración inicial de ADN equivalente a 1000 promastigotes/ μ l, que se obtuvo mediante extracción en las mismas condiciones que las muestras a analizar (Kit de Extracción DNA SSS de REAL, Durviz s.l.u.). Dicho ADN procedía de la misma cepa de *L. infantum* utilizada como antígeno en la técnica IFI (MCAN/ES/90/DP204; zimodemo MON-1=GR-1). Previamente a la extracción, los promastigotes se cultivaron en R.P.M.I-1640, se lavaron con P.B.S. y se contaron en cámara de Neubauer.

Tras el proceso de amplificación se han obtenido 8 valores de Ct (véase Fig. 8.) correspondientes a cada una de las concentraciones incluidas en la curva estándar. El software proporcionado con el aparato de PCR en tiempo real ("MXPro" de Agilent Technologies) utiliza estos valores para crear la curva de calibrado (Fig. 81).

Las propiedades de la recta patrón obtenida son las siguientes:

- RSq (Coeficiente de Determinación o Coeficiente de Correlación al cuadrado R^2) = 0,975
- La recta obtenida se ajusta a la ecuación: $y = -3,333 \cdot \text{LOG}(X) + 32,02$
- Eficiencia: 99,5%

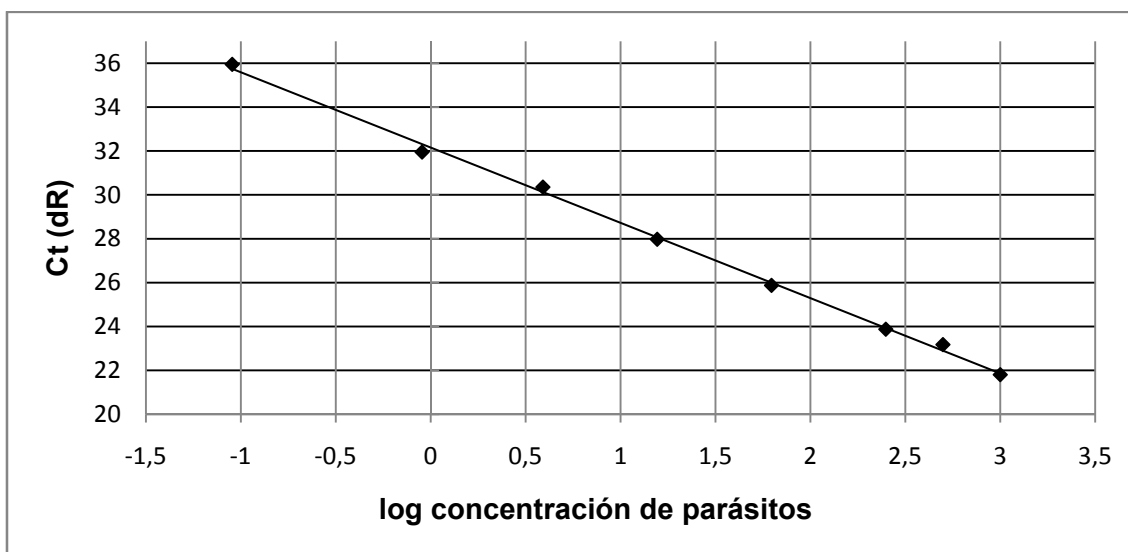


Figura 81. Curva estándar. Logaritmo de las concentraciones de parásitos comprendidas entre 1000 y 0.09 parásitos (abscisas) frente a los valores de Ct (ordenadas). $RSq = 0,975$; $Y = -3,333 * LOG(X) + 32,02$; Eficiencia = 99,5%.

Tratamiento de los resultados:

Se ha procedido a analizar las muestras problema, incluyendo controles negativos de PCR, negativos de extracción y positivos de PCR. Al término de cada reacción los resultados se interpretaron usando el mencionado software MXPro (Agilent Technologies), obteniéndose los valores de Ct correspondientes a cada muestra y volumen de ADN ensayado. Utilizando una aplicación incluida en el propio programa, estos valores de Ct son interpolados en la curva de calibrado para obtener las carga parasitaria presente en cada muestra.

Se ha realizado la media ponderada de las 3 concentraciones de parásitos obtenidas para conocer la densidad de parásitos por cada μl de ADN problema. El valor resultante se multiplicó por el factor de dilución (0,1) para expresar los resultados obtenidos en parásitos/ μl de sangre completa (durante la extracción del ADN se parte de 200 μl de sangre completa o aspirado medular para resuspender el extracto final de ADN en 20 μl de agua para inyectables).

BIBLIOGRAFÍA

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. 289 p.

Acedo-Sánchez C. 1993. Aspectos epidemiológicos de la leishmaniosis canina y humana en el sur de España. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. 217 p.

Acedo-Sánchez C., Martín-Sánchez J., Vélez-Bernal I.D., Sanchís-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*, 25(3): 303-10.

Acedo-Sánchez C., Morillas-Márquez F., Sanchís-Marín M.C., Martín-Sánchez J. 1998. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Vet Parasitol*, 75: 1-8.

Adel A., Saegerman C., Speybroeck N., Praet N., Victor B., De-Deken R., Soukehal A., Berkvens D. 2010. Canine leishmaniasis in Algeria: True prevalence and diagnostic test characteristics in groups of dogs of different functional type. *Vet Parasitol*, 172: 204-13.

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.

Alcalde-Alonso M.M. 1988. Aproximación al estudio epidemiológico, clínico y terapéutico de las leishmaniosis cutáneas en la provincia de Granada. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Alexander B., Maroli M. 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*, 17: 1-18.

Alexander J., Satoskar A.R., Russell D.G. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*, 112: 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.

Alonso F., Giménez-Font P., Manchón M., Ruiz-de-Ybáñez R., Segovia M., Berriatua E. 2010. Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean area. *Zoon Pub Health*, 57: 318-28.

Alvar J. 1997. *La leishmaniosis: de la biología al control*. Primera edición. Salamanca. Laboratorios Intervet S.A.

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.

Amela C., Méndez I., Torcal J.M., Medina G., Pachón I. Cañavate C., Alvar J. 1995. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol*, 11: 157-61.

Amusatogui 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: 154-7.

Antinori S., Cascio A., Parravicini C., Bianchi R., Corbellino M. 2008. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet*, 8: 191-9.

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: 416-20.

- Ariza-Astolfi C., Úbeda-Ontiveros J.M., Guevara-Benítez D., Cutillas-Barrios C., de-Rojas-Álvarez M., Reina-Mulero F.** 2007. Epidemiología de la Leishmaniosis Canina en la Provincia de Sevilla (España). Actas del X Congreso Ibérico de Parasitología (Cip 10). Madrid. p. 49.
- Arnedo-Pena A., Bellido-Blasco J.B., Gozález-Morán F., Arias-Sánchez A., Calvo-Más C., Safont-Adsuara L., Fabra-Peirat E., Criado-Juarez J., Pons-Roig P.** 1994. Leishmaniosis en Castellón: estudio epidemiológico de los casos humanos, vector y reservorio canino. Rev San Hig Púb, 68 (4): 481-91.
- Ashford R.W.** 1997. The leishmaniasis as model zoonoses. Ann Trop Med Parasitol, 91 (7): 693-701.
- Ashford R.W.** 1998. The Leishmaniasis. En: Palmer S.R., Lord Soulsby and Simpson D.I.H. (eds), *Zoonoses: Biological, Clinical Practice and Public Health Control*. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 527–44.
- Ashford R.W.** 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol, 30: 1269-81.
- Ashford D.A., Bozza M., Freibe M., Miranda J.C., Sherlock I., Eulalio C., Lopes U., Fernandes O., Degraeve W., Barker Jr R.H., Badaro R., David J.R.** 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, 53(3): 251-5.
- 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: 11-6.
- Baneth G., Aroch I.** 2008. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. Vet J, 175: 14-5.
- Baneth G., Koutinas A.F., Solano-Gallego L., Bourdeau P., Ferrer L.** 2008. Canine leishmaniasis – 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 Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Adv Parasitol*, 64: 1-109.

Barbieri C.L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Paras Immunol*, 28: 329-37.

Barón S.D., Morillas-Márquez F., Morales-Yuste M., Díaz-Sáez V., Irigaray C., 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: 1234-44.

Basset D., Faraut F., Marty P., Dereure J., Rosenthal E., Mary C., Pralong F., Lachaud L., Bastien P., Dedet J.P. 2005. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microb Infect*, 7: 1370-5.

Bates P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37 (10-3): 1097-106.

Bell A.S., Ranford-Cartwright L.C. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol*, 18(8): 337-42.

Benito-Hernández M., Pérez-Díaz J.V., Osuna-Calvet B., Domínguez M.T., Vega-García S. 2004. The importance of a continued serovigilance in the control of canine leishmaniasis. A comparison of two methods of control. *Épidémiol Santé Anim*, 45: 87-90.

Berrahal F., Mary C., Roze M., Berenger A., Escoffier K., Lamouroux D., Dunan S. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hig*, 55: 273-7.

Bettini S., Gradoni L. 1986. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect Sci Appl*, 7: 241-5.

Bhattarai N.R., Van-der-Auwera G., Rijal S., Picado A., Speybroeck N., Khanal B., De-Doncker S., Lal-Das M., Ostyn B., Davies C., Coosemans M., Berkvens

D., Boelaert M., Dujardin J-C. 2010. Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. *Emerg Infect Dis*, 16 (2): 231-7.

Biglino A., Bolla C., Concialdi E., Trisciuglio A., Romano A., Ferroglio E. 2009. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in a traditionally non-endemic area of North-western Italy (Piemonte region). *J Clin Microbiol*, On-line, doi:10.1128/JCM.00416-09, p. 1-16.

B.O.E. del 15 de Enero de 1982 (nº13). Resolución de 22 de diciembre de 1981, de la Dirección General de Salud Pública, por la que se modifica la lista de enfermedades de declaración obligatoria, Anexo I. Ministerio de Sanidad y Consumo, p. 907.

Boehme C.C., Hain U., Novosel A., Eichenlaub S., Fleischmann E., Löscher T. 2006. Congenital visceral leishmaniasis. *Emerg Infect Dis*, 12 (2): 359-60.

B.O.J.A. del 8 de Enero de 2009 (nº4). ORDEN de 11 de diciembre de 2008, por la que se modifica la Orden de 19 de diciembre de 1996, por la que se desarrolla el Sistema de Vigilancia Epidemiológica en la Comunidad Autónoma de Andalucía y se establece la relación de enfermedades de declaración obligatoria, Anexo I. Consejería de Salud, pp. 69-71.

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.

Botet J., Serra T., Portús M., Mora R., Gallego M. 1987. Incidencia de la leishmaniosis en el área de Barcelona. *Rev Ibér Parasitol*, Vol. Extr.: 51-4.

Boussa S., Guernaoui S., Pesson B., Boumezzough A. 2005. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta Trop*, 95: 86-91.

Brazal-García T., Ruiz-Atienza R., Fernández-García M.I. 1990. Estudio de la incidencia de la leishmaniosis visceral canina en la comarca de Alicante por medio

de la inmunofluorescencia indirecta. Resúmenes del I Congreso de Zoonosis, Valencia, pp.166-9.

Cabezón O., Millán J., Gomis M., Dubey J.P., Ferroglio E., Almería S. 2010. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. *Parasitol Res*, 107: 1505-8.

Cabral M., O'Grady J., Alexander J. 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Paras Immunol*, 14: 531-9.

Cabral M., O'Grady J.E., Gomes S., Sousa J.C., Thompson H., Alexander J. 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 76: 173-80.

Cairó-Vilagran J., Font-Grau J. 1991. Leishmaniosis canina. Aspectos clínicos. *Clín Vet Peq Anim*, 11 (2): 74-81.

Carcelén J., Iniesta V., Fernández-Cotrina J., Serrano F., Parejo J.C., Corraliza I., Gallardo-Soler A., Marañón F., Soto M., Alonso C., Gómez-Nieto C. 2009. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, 27: 5964-73.

Carmona-Espinazo F.F., Espigares-Jiménez M., Mangas-Rojas A., Biedma-Álvarez D. 2004. Leishmaniosis visceral en paciente inmunocompetente: una entidad a considerar en el diagnóstico diferencial de la fiebre de origen desconocido. *Cartas al director. An Med Int*, p. 466.

Castañeda R., Carpio I., Asensio A., Alberdi J. C., García S., Domínguez T., Moreno S. 1999. Estudio de seroprevalencia de la leishmaniosis canina en perros censados en Madrid. *Consulta de Difusión Veterinaria*, On-line: www.consultavet.org, 7 (65): 836-41.

Castillo-Hernández J.A., Sánchez-Acedo C., Gutiérrez-Galindo J.F., Lucientes-Curdi J., Estrada-Peña A., Galmés-Femenías M. 1985. Estudio

epidemiológico de la leishmaniosis en la provincia de Zaragoza. Resúmenes de las comunicaciones presentadas al IV Congreso Nacional de Parasitología. Tenerife, 9-13 de Julio.

Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev*, 73: 203-66.

Chance M.L. 1981. The Six Diseases of WHO. *Brit Med J*, 283: 1245-7.

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.

Collantes F., Martínez-Ortega E. 1997. Sobre la validez taxonómica de *Phlebotomus longicuspis* (Nitzulescu, 1931) (Diptera: Psychodidae). *Bol Asoc Esp Entomol*, 21 (3-4): 141-6.

Colombo F.A., Odorizzi R.M.F.N., Laurenti M.D., Galati E.A.B., Canavez F., Pereira-Chioccola V.L. 2011. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res*, 109: 267-74.

Colwell R., Epstein P., Gubler D., Hall M., Reiter P., Shukla J., Sprigg W., Takafuji E., Trtanj J. 1998. Global climate change and infectious diseases. *Emerg Infect Dis*, 4 (3): 451-2.

Conesa-Gállego E. 1994. Los flebotomos (Diptera: Psychodidae) de la comunidad de Madrid. Implicaciones epidemiológicas. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. 381 p.

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: 43-50.

Cook G.C. 1992. Effect of global warming on the distribution of parasitic and other infectious diseases: a review. *J R Soc Med*, 85: 688-91.

Cox F.E.G. 2002. Systematics of the parasitic Protozoa. *Trends Parasitol*, 18(3): 108.

Criado-Fornelio A., Gutierrez-Garcia L., Rodriguez-Cabeiro F., Reus-Garcia E., Roldan-Soriano M.A., Diaz-Sanchez M.A. 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol*, 92: 245-51.

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.

Cruz I., Nieto J., Moreno J., Cañavate C., Desjeux P., Alvar J. 2006. *Leishmania*/ HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*, 123: 357-88.

Curtis C.F., Lines J.D. 2000. Should DDT be banned by international treaty? *Parasitol Today*, 16 (3): 119-21.

Czerny L., Strobl G. 1909. Spanische Dipteren III. Beitrag. *Verhandlungen der Zoologisch-botanischen Gesellschaft*, 59: 121-301.

Dantas-Torres F. 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis in *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*, 149: 139-46.

Dantas-Torres F. 2011. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol*, 27: 155-9.

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-Freitas E., Melo M.N., da Costa-Val A.P., Michalick M.S. 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. Vet Parasitol, 137: 159-67.

de-la-Rosa R., Pineda J.A., Delgado J., Macías J., Morillas F., Martín-Sánchez J., Leal M., Sánchez-Quijano A., Lissen E. 2001. Influence of highly active antiretroviral therapy on the outcome of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. Clin Infect Dis, 32: 633-5.

de-la-Rosa R., Pineda J.A., Delgado J., Macías J., Morillas F., Mira J.A., Sánchez-Quijano A., Leal M., Lissen E. 2002. Incidence of and Risk Factors for Symptomatic Visceral Leishmaniasis among Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients from Spain in the Era of Highly Active Antirretroviral Therapy. J Clin Microbiol, 40 (3): 762-7.

de-Meeûs T., Renaud F. 2002. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. Trends Parasitol, 18(6): 247-51.

del-Giudice P., Marty P., Lacour J.P., Perrin C., Pratlong F., Haas H., Dellamonica P., Fichoux Y.L. 1998, Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. Case report and literature review. Arch Dermatol, 134: 193-8.

Desjeux P. 1996. Leishmaniasis: Public health aspects and control. Clin Dermatol, 14: 417-23.

Desjeux P. 2001. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. Med Microbiol Immunol, 190: 77-9.

Desjeux P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 27: 305-18.

Desjeux P., Alvar J. 2003. *Leishmania*/ HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol, 97 (1): 3-15.

Díaz-Espiñeira M.M., Slappendel R.J. 1997. A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands. *Vet Quarterly*, 19:69-71.

Dipineto L., Manna L., Baiano A., Gala M., Fioretti A., Gravino A.E., Menna L.F. 2007. Presence of *Leishmania infantum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Southern Italy. *J Wildl Dis*, 43 (3): 518-20.

Dolmatova A.V., Demina N.A. 1971. Les phlébotomes (*Phlebotominae*) et les maladies qu'ils transmettent. Cap. 6. Étude anatomique et physiologique des *Phlebotominae* ailés. Éditions Off Rech Sci Tech Outre-Mer, pp. 89-95.

Dougall A.M., Alexander B., Holt D.C., Harris T., Sultan A.H., Bates P.A., Rose K., Walton S.F. 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* en Australia. *Int J Parasitol*, 41: 571-9.

Dowlati Y., Pharm D. 1996. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin Dermatol*, 14: 425-31.

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.

Egea-Valenzuela J., Baños-Madrid R., Rodrigo-Agudo J.L., Galera-Peñaranda C., Torroba A., Molina-Martínez J., Carballo-Álvarez F. 2009. Leishmaniasis duodenal en paciente VIH positivo. *Rev Esp Enferm Dig*, 101 (1): 60-2.

Encinas-Grandes A., Gómez-Bautista M., Martín-Novo M., Simón-Martín F. 1988. Leishmaniasis in the province of Salamanca, Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. *Ann Parasitol Hum Comp*, 63 (6): 387-97.

Evans D., Godfrey D., Lanham S., Lanotte G., Modabber F., Schnur L. 1989. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of *Leishmania*. Geneva, Switzerland: WHO, pp. 28–32.

Fernández-Bellón H., Solano-Gallego L., Bardagí M., Alberola J., Ramis A., Ferrer L. 2006. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol*, 135: 181–5.

Fernández-Bellon 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: 32-6.

Fernández-Bellon H., Solano-Gallego L., Rodríguez A., Rutten V.P.M.G., Hoek A., Ramis A., Alberola J., Ferrer L. 2005. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 107: 163-9.

Fernández-Martínez F., Camacho-Alexandre F. 1913. El Kala-azar infantil en las costras granadinas. *Act. Med.*, 3: 82-93.

Ferreira M.G., Fattori K.R., Souza F., Lima V.M. 2009. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol*, 165 (1-2):150-4.

Fisa R., Gállego M., Castillejo S., Aisa M.J., Serra T., Riera C., Carrió J., Gállego J., Portús M. 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol*, 83: 87-9.

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

Fisa R., Portús M., Gállego M., Valls D., Aisa M.J. 1992. El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina en la comarca del Priorat (Tarragona). *Clín Vet Peq Anim*, 12 (4): 231-6.

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. 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*, 14: 1-14.

Gállego-Berenguer J. 2006. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Edicions Universitat de Barcelona. Barcelona. 491 p. ISBN 84-475-3141-4.

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). 597 p.

Gállego M. 2004. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis. *Sci Tech Rev Off Int Epiz*, 23 (2): 661-76.

Gállego M., Pratlong F., Fisa R., Riera C., Rioux J.A., Dedet J.P., Portús M. 2001. The life cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95 (3): 269-71.

Gállego M., Riera C. 2000. Las leishmaniasis humanas: leishmaniasis autóctona por *Leishmania infantum*. Unitat de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona. Control Calidad SEIMC.

Gálvez R., Descalzo M.A., Miró G., Jiménez M.I., Martín O., Dos-Santos-Brandao F., Guerrero I., Cubero E. y Molina R. 2010. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniasis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop*, 115: 95-102.

- Gálvez R., Miró G., Descalzo M.A., Nieto J., Dado D., Martín O., Cubero E. y Molina R.** 2010. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol*, 169: 327-34.
- García-Almagro D.** 2005. Leishmaniasis cutánea. *Act Dermo-Sifiliogr*, 96 (1): 1-24.
- Garrote J.I., Gutiérrez M.P., López-Izquierdo R., Dueñas M.A.I., Zarzosa P., Cañavate C., El-Bali M., Almaraz A., Bratos M.A., Berbel C., Rodríguez-Torres A., Orduña-Domingo A.** 2004. Seroepidemiologic study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon, Spain. *Am J Trop Med Hyg*, 71 (4): 403-6.
- 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: 45-52.
- Gradoni L., Gramiccia M., Mancianti F., Pieri S.** 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82: 568-71.
- Gramiccia M., Gradoni L.** 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*, 35: 1169-80.
- Gramiccia M., Smith D.F., Angelici M.C., Ready P.D., Gradony L.** 1992. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitology*, 105: 29-34.

Grande-Tejada A.M., Cardesa-García J.J., Vagace-Valero J.M., García-Domínguez M., Bejarano-Ramírez N. 2004. Leishmaniasis visceral, a propósito de tres casos. *Vox Paediatr*, 12 (1): 34-8.

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.

Hernández-Rodríguez S., Martínez-Moreno A. 1992. Leishmaniosis canina. En: *Avances en Parasitología: Protozoología*. Coord: Sanmartín-Durán M.L. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. p. 93-120.

Hertig M. 1950. Observations on the Density of Phlebotomus Populations following DDT Campaigns. *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 2 No. 4 pp. 621-8.

Herwaldt B.L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, 354: 1191-9.

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.

Iniesta-González L. 2007. Diagnóstico de la leishmaniosis críptica en el perro. Expresión isotípica e idiotípica de los anticuerpos producidos en distintas fases de la infección. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

Jobling B. 1987. Anatomical drawing of biting flies. British Museum (Natural History) and the Wellcome Trust, London. 119 pp.

Jones K.E., Nikkita G.P., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L., Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451: 990-4.

Khasnis A.A., Nettleman M.D. 2005. Global warming and infectious disease. *Arch Med Res*, 36: 689-96.

Kaye P., Scott P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature*, 9: 604-15.

Killick-Kendrick R. 1987. Breeding places of *Phlebotomus ariasi* in the Cevennes focus of leishmaniasis in the South of France. *Parassitologia*, 29: 181-191.

Killick-Kendrick R. 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clin Dermatol*, 17: 279-89.

Koehler K., Stechele M., Hetzel U., Domingo M., Schönian G., Zahner H., Burkhardt E. 2002. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 109: 9-17.

Kramer L., Calvi L.E., Grandi G. 2006. Immunity to *Leishmania infantum* in the dog: Resistance and Disease. *Vet Res Commun*, 30 (1): 53-7.

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.

Lafferty K.D. 2009. The ecology of climate change and infectious diseases. *Ecology*, 90 (4): 888-900.

Lafferty K.D. 2010. The ecology of climate change and infectious diseases: reply. *Ecology*, 91(3): 928-9.

Lainson R., Shaw J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. En: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. 1 (Peters W., Killick-Kendrick R.), London: Academic Press. pp. 1-120.

Lanotte G., Rioux J.A., Croset H., Vollhardt Y. 1974. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 7 Dépistage de l'enzootie canine par les méthodes immunosérologiques. *Ann Parasitol Hum Comp*, 49 (1): 41-62.

Le-Fichoux Y., Quaranta J.F., Auvévre J.P., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Rousseau D., Kubar J. 1999. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in

asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol*, 37 (6): 1953-7.

Léger N., Depaquit J. 1999. Les phlébotomes. En: Dedet J.P. (Ed). Les leishmanioses. Ellipses. pp. 89-108.

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.

Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Eukaryot Microbiol*, 27: 37-58.

Lewis D.J. 1975. Functional morphology of the mouth parts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Trans R Ent Soc Lond*, 126 (4): 497-532.

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., Pérez-Molina J.A., Guerrero A., Baquero F., Villarrubia J., Escribano L., Bellas C., Pérez-Corral F., Alvar J. 1998. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with

human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. Am J Trop Med Hyg, 58 (4): 436-43.

Lucientes J., Blasco-Zumeta J., Zárata J.J., Arbea J.I., Latorre E. 2001. Primeros registros del insecto del género *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) para los Monegros (Zaragoza, España). Bol Soc Entomol Aragonesa, 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. Rev Aragon Entomol, 4: 19-22.

Maia C., Campino L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol, 158: 274-87.

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

Mancianti F., Gramiccia M., Gradoni L., Pieri S. 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg, 82: 556-7.

Mancianti F., Mignone W., Galastri F. 1994. Serologic survey for leishmaniasis in free-living Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. J Wildl Dis, 30 (3): 454-6.

Mancianti F., Pedonese F., Poli A. 1996. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. Vet Parasitol, 65: 1-9.

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: 251-62.

Maroli M., Mizzoni V., Siragusa C., D`Orazi A., Gradoni L. 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of

deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol*, 15: 358-63.

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.

Martín-Ezquerro G., Fisa R., Riera C., Rocamora V., Fernández-Casado A., Barranco C., Serra T., Baró T., Pujol R.M. 2009. Role of *Leishmania* spp. infestation in nondiagnostic cutaneous granulomatous lesions: report of a series of patients from a Western Mediterranean area. *Brit J Dermatol*, 161 (2): 320-5.

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: 267-73.

Martín-Sánchez J., Gállego M., Barón S., Castillejo S., Morillas-Márquez F. 2006. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100: 527-32.

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: 228-32.

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: 247-54.

Martín-Sánchez J., Guilvard E., Acedo-Sánchez C., Volf-Echeverri M., Sanchiz-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: 405-8.

Martín-Sánchez J., Lepe J.A., Toledo A., Ubed J.M., Guevara D.C., Morillas-Márquez F., Gramiccia M. 1999. *Leishmania (Leishmania) infantum* enzymatic variants causing canine leishmaniasis in the Huelva province (south-west Spain). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93: 495-6.

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: 607-15.

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., 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: 177-82.

Martínez-Cruz M.S., Martínez-Moreno A., Martínez-Moreno F.J., Martínez-Gómez F., Hernández-Rodríguez S. 1990. Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba. *Rev Ibér Parasitol*, 50 (1-2): 1-7.

Martínez-Ortega E. 1985a. Los flebotomos ibéricos (*Diptera: Psychodidae*). I. Almería. *An Biol*, 3 (Biología Animal, 1): 107-11.

Martínez-Ortega E. 1985b. Los flebotomos ibéricos (*Diptera: Psychodidae*). III. El Sureste. *An Biol*, 3 (Biología Animal, 1): 113-9.

Martínez-Ortega E., Conesa-Gállego E. 1987a. Estructura de las poblaciones de los flebotomos (*Dipt., Psychodidae*) del sureste de la Península Ibérica. Mediterránea. *Ser Estud Biol*, 9: 87-99.

Martínez-Ortega E., Conesa-Gállego E. 1987b. Caracteres morfológicos de interés taxonómico de los flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Península Ibérica. *An Biol*, 11(Biología Animal, 3): 43-53.

Martínez-Ortega E., Conesa-Gállego E., Romera-Lozano H. 1996. *Phlebotomus (Larrousius) langeroni* Nitzulescu, 1930 (Diptera, Psychodidae), espèce nouvelle pour l'Espagne. *Parasite*, 3: 77-80.

Mathis A., Deplazes P. 1995. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol*, 33 (5): 1145-9.

Maurício I.L., Stothard J.R., Miles M.A. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, 16 (5): 188-9.

Miranda S., Roura X., Picado A., Ferrer L., Ramis A. 2008. Characterization of sex, age and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. *Res Vet Sci*, 85: 35-8.

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., Montoya A., Mateo M., Alonso A., García S., García A., Caballero M.J., Molina R. 2007. A leishmaniasis surveillance system among stray dogs in the región of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res*, 101: 253-7.

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: 491-3.

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.

- Moral L., Rubio E.M., Moya M.** 2002. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacantí Region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96: 129-32.
- Moreira E.D., De Souza V.M.M., Sreenivasan M., Lopes N.L., Barreto R.B., De Carvalho L.P.** 2003. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 69 (4): 393-7.
- Moreno J., Alvar J.** 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 18 (9): 399-405.
- Morillas-Márquez F.** 1981. Epidemiología de las leishmaniasis en la provincia de Granada: estudio biométrico, sistemático y del ciclo anual de los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae). Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. 256 pp.
- Morillas F., Martín-Sánchez J., Acedo C., Sanchís-Marín M.C.** 1995. Importancia actual de las leishmaniasis en España. *Ars Pharmac*, 36 (1): 19-40.
- Morillas F., Sanchez-Rabasco F., Ocaña J., Martín-Sánchez J., Ocaña-Wihelmi J., Acedo C., Sanchiz-Marín M.C.** 1996. Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res*, 82: 569-70.
- 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., Macias J., Sanjuan-García J.A. 2002. *Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): Transmission from infected Patients to Experimental Animal under Conditions That Stimulate Needle-Sharing. *Exp Parasitol*, 100: 71-4.

Morillas-Márquez F., Sanchís-Marín M.C., Acedo-Sánchez C., Morillas-Márquez A., Martín-Sánchez J. 1992. Encuesta sero-epidemiológica sobre la leishmaniosis canina e infección del flebotomo vector por *Leishmania*, en la provincia de Almería (Sur de España). En: "In memoriam" al profesor Doctor D.F. de P. Martínez Gómez. Edit. Hernández-Rodríguez S. Universidad de Córdoba, pp. 135-47.

Morillas-Márquez F., Sanchís-Marín M.C., Martín-Sánchez J., Acedo-Sánchez C. 1991. On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Almeria in southeastern Spain. *Parassitologia*, 33 (Sup. 1): 437-44.

Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366: 1561-77.

Nieto C.G., García-Alonso M., Requena J.M., Mirón C., Soto M., Alonso C., Navarrete I. 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of the *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 67: 117-30.

Nieto C.G., Navarrete I., Habela M., Hernández-Rodríguez S. 1992. Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain. *Prev Vet Med*, 13: 173-8.

- Oliva G., Scalone A., Manzillo V.F., Gramiccia M., Pagano A., Di Muccio T., Gradoni L.** 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and Nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*, 44 (4): 1318-22.
- Oliveira C.D.L., Morais M.H.F., Machado-Coelho G.L.L.** 2008. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cuad Saúd Púb*, 24: 2953-8.
- Oliveira F.S., Brazil R.P., Pacheco R.S.** 2005. Response to Silva et al.: Usefulness of PCR-based methods for screening *Leishmania* in epidemiological studies. *Trends Parasitol*, 21(12): 552-3.
- 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.
- Otranto D., Paradies P., Sasanelli M., Spinelli R., Brandonisio O.** 2004. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 42 (6): 2769-70.
- Ozon C., Marty P., Pratlong F., Breton C., Blein M., Lelièvre A., Haas P.** 1998. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet Parasitol*, 75: 273-7.
- Pagliano P., Carannante N., Rossi M., Gramiccia M., Gradoni L., Saverio-Faella F., Battista-Gaeta G.** 2005. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. *J Antimicrob Chemother*, 55: 229-33.
- Pennisi M.G., Venza M., Reale S., Vitale F., Giudice S.** 2004. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun*, 28: 363-6.
- Pesson B., Ready J.S., Benabdennbi I., Martín-Sánchez J., Esseghir 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.

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: 414-7.

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: 354-7.

Pinelli E., Killick-Kendrick R., Wagenaar J., Bernadina W., del Real G., Ruitenbergh J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*, 62 (1): 229-35.

Pittaluga G., de-Buen S. 1918. Especies españolas del género *Phlebotomus* (Ins.Dip.). *Bol R Soc Esp Hist Nat*, 18: 377-85.

Poli A., Abramo F., Basortti P., Leva S., Gramiccia M., Ludovisi A., Mancianti F. 2002. Feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol*, 106: 181-91.

Portús M., Fisa R., Serra T., Gállego M., Mora R. 1987. Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. *Med Vet*, 4 (11): 569-75.

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 leishmaniasis in Catalonia, and associated vector distribution. *Rev Ibér Parasitol*, 67 (1-4): 59-67.

Portús M., Gállego M., Seguí M.G., Sole J. 1994. Is leishmaniasis endemic on the island of Minorca (Spain)? A human visceral case after living 13 years in Minorca. *Parasite*, 1: 87-8.

Pratlong F., Dedet J.P., Marty P., Portús M., Deniau M., J. Dereure J., Abranches P., Reynes J., Martini A., Lefebvre M., Rioux J.A. 1995. Leishmania-Human Immunodeficiency Virus Coinfection in the Mediterranean Basin: Isoenzymatic Characterization of 100 Isolates of the *Leishmania infantum* Complex. *J Infect Dis*, 172 (1): 323-6.

Pratlong F., Dereure J., Deniau M., Marty P., Faraut-Gambarelli F., Dedet J.P. 2003. Enzymatic polymorphism during *Leishmania*/HIV co-infection: a study of 381 *Leishmania* strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. *Ann Trop Med Parasitol*, 97 (1): S54-S56.

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.

Properi S. Climate changes and emerging diseases. *Vet Res Commun*, 30(Sup.1): 83-6.

Quinnell R.J., Courtenay O. 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136: 1915-34.

Ranque J., Dunan S., Franck J., Quilici M. 1978. Valeur et interprétation des résultats séro-épidémiologiques dans la leishmaniose viscérale méditerranéenne. R.M.S.M. 3: 203-6.

Ready P.D. 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 27(2): 399-412.

Real Decreto 2210/1995 (28 de Diciembre de 1995), por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Enfermedades endémicas de ámbito regional, Anexo III.

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): 2931-35.

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.

Reyes-Magaña A., Morillas-Márquez F., Monts-Ramírez E., Sanchís-Marín M.C., Benavides-Delgado I., González C.J. 1989. La leishmaniosis en la provincia de Granada: estudio de la enzootia canina. Ars Pharm, 30:35-44.

Reyes-Magaña A., Morillas-Márquez F., Valero-López A., González-Castro J., Benavides-Delgado I., Sanchis-Marín M.C. 1988. Encuesta sobre la leishmaniosis canina en las comarcas naturales de la provincia de Granada (Sur de España). Rev Ibér Parasitol, 48 (3): 233-40.

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: 899-904.

Rioux J.A. 1982. The varied ecological and epidemiological forms of cutaneous leishmaniasis in the Mediterranean Basin. Informe realizado para la World Health Organization (W.H.O.). Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva.

Rioux J.A., Albaret J.L., Houin R., Dedet J.P., Lanotte G. 1968. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes L.*). Ann Parasitol Hum Comp, 43: 421–8.

Rioux J.A., Croset H., Lanotte G. 1977. Écologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose visérale. Essai de modélisation. Colloque International du C.N.R.S. 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. 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., Lanotte G., Pratlong F., Dereure J., Jarry D., Moreno G., Killick-Kendrick R., Perieres J., Guilvard E., Belmonte A. 1985. La leishmaniose cutanée autochtone dans le Sud Est de la France: resultants d'une enquête éco-épidémiologique dans les Pyrenées Orientales. Méd Malad Infect, 15 (11): 650-6.

Rittig M.G., Bogdan C. 2000. *Leishmania*-Host-Cell Interaction: Complexities and Alternative Views. Parasitol Today, 16(7): 292-7.

Rivas-Martínez S. 1983. Pisos bioclimáticos de España. Lazaroa 5: 33-43.

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. 268 p.

Rodrigues A.C., dos Santos A.B., Feitosa L.F., Santana C.S., Nascimento E.G., Moreira E.D. Jr. 1999. Criação peridomicilar de galináceos aumenta o risco de leishmaniose visceral humana. *Rev Soc Bras Med Trop*, 32: 12-3.

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: 683-93.

Rolão N., Martins M.J., João A., Campino L. 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12: 183-6.

Romero-Peñuela M.H., Sánchez-Valencia J.A. 2007. El diagnóstico de la leishmaniosis visceral canina (*Leishmania infantum*). *Vet Zootec*, 1 (1): 51-9.

Rosypal A.C., Troy G.C., Zajac A.M., Frank G., Lindsay D.S. 2005. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected Beagle. *J Parasitol*, 91 (4): 970-2.

Ruiz-de-Ybáñez R., del-Río L., Martínez-Carrasco C., Segovia M., Cox J., Davies C., Berriatua E. 2009. Questionnaire survey on canine leishmaniosis in southeastern Spain. *Vet Parasitol*, 164: 124-33.

Sánchez-Botija C. 1936. Leishmaniosis canina. Algunas observaciones sobre los caracteres generales del foco endémico en Madrid. *Rev Hig San Pec*, 26 (3): 148-58.

Sanchis-Marín M.C. 1986. Flebotomos de la provincia de Almería. Estudio taxonómico e importancia epidemiológica. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España.

Sanchis-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 Pharm*, 38 (1): 53-61.

Sanchis-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 Ibér Parasitol*, 46: 285-91.

Sanchis-Marín M.C., Villegas G., Morillas-Márquez F. 1986. Flebotomos y leishmaniosis en la provincia de Almería. *Rev San Hig Púb*, 60: 1131-9.

Schlein Y. 1993. *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today*, 9 (7): 255-8.

Schlein Y., Jacobson R.L. 1999. Sugar meals and longevity of the sandfly *Phlebotomus papatasi* in an arid focus of *Leishmania major* in the Jordn Valley. *Med Vet Entomol*, 13: 65-71.

Schlein Y., Jacobson R.L., Muller G.C. 2001. Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 65: 300-3.

Schönian G., Mauricio I., Cupolillo E. 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. *Trends Parasitol*, 26 (10): 466-9.

Schönian G., Mauricio I., Gramiccia M., Canavate C., Boelaert M., Dujardin J.C. 2008. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol*, 24:135–42.

Segovia M., Martín-Luengo F. 1985. Leishmaniasis in the south-east of Spain: preliminary results of a serological and parasitological study in dogs. *Ann Trop Med Parasitol*, 79 (3): 337-8.

Seguí-Puntas M.G. 1991. Estudi epidemiològic de la leishmaniosi a l'illa de Menorca. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

Semião-Santos S.J., Abranches P., Silva-Pereira M.C.D., Santos-Gomes G.M., Fernandes J.P., Vetter J.C.M. 1996. Reliability of serological methods for detection of leishmaniasis in Portuguese domestic and wild reservoirs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91 (6): 747-50.

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: 235-9.

Sesma B., Barricarte A. 1997. Leishmaniasis en Navarra: Revisión de Actuaciones. *An Sist Sanit Navar*, 20 (2).

Shabaan-El-Hossary S. 2006. Morphological characteristics for sand fly taxonomy. Research and Training Center on Vectors of Diseases, Ain Shams University. 25 p.

Sharma U., Singh S. 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vect Borne Dis*, 45: 255-72.

Shuman E.K. 2010. Global climate change and infectious diseases. *New Eng J Med*, 362(12): 1061-3.

Singh K.V. 1999. Studies on the role of climatological factors in the distribution of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in semi-arid areas of Rajasthan, India. *J Arid Environ*, 42: 43-8.

Singh S., Sivakumar R. 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med*, 49: 55-60.

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: 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., Llull J., Ramis A., Fernández-Bellon H., Rodríguez A., Ferrer L., Alberola J. 2005. Longitudinal study on dogs living in an area of Spain

highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *Am Soc Trop Med Hyg*, 72 (6): 815-8.

Solano-Gallego L., Llull J., Ramos G., Riera C., Arboix M., Alberola J., Ferrer L. 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 90: 37-45.

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., Rodríguez-Cortés A., Iniesta L., Quintana J., Pastor J., Espada Y., Portús M., Alberola J. 2007. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg*, 76 (4): 676-80.

Soto M., Requena J.M., Quijada L., Alonso C. 1998. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 36 (1): 58-63.

Srividya G., Kulshrestha A., Singh R., Salotra O. 2011. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitol Res*, On-line. DOI 10.1007/s00436-011-2680-1.

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: 1729-33.

Sundar S., Rai M. 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagnostic Laborat Immunol*, 9 (5): 951-8.

Sutherst R.W. 2004. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17(1): 136-73.

Tabar M.D., Altet L., Francino O., Sánchez A., Ferrer L., Roura X. 2008. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet Parasitol*, 151: 332-6.

Theodor O. 1958. Psychodidae, Phlebotominae. En: *Die Fliegen der Palearktischen Region*. Ed. E. Schweizerbart, Stuttgart: 55 pp.

Úbeda-Ontiveros J.M., Morillas-Márquez F., Guevara-Benítez D.C., López-Román R., Cutillas-Barrios C. 1982. Flebotomos de las Islas Canarias (España). *Rev Ibér Parasitol*, Vol. Extra: 197-206.

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*. 16: 253-7.

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.

Verin R., Poli A., Ariti G., Nardoni S., Fanucchi M.B., Mancianti F. 2010. Detection of *Leishmania infantum* DNA in tissues of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Italy. *Eur J Wildl Res*, 56: 689-92.

Vidor E., Dereure J., Pratlong, F., Dubreuil, N., Bissuel, G., Moreau, Y. & Rioux, J. 1991. Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine a *Leishmania infantum*. Etude d'une cohort en région Cévenole. *Prat Méd Chir Anim Comp*, 26: 133-7.

Villar-Lama A., Ojeda-Zújar J. 2007. Evolución reciente de los suelos urbanos-alterados en el litoral de Andalucía (1998-2004). XX Congreso AGE: "La geografía en la frontera de los conocimientos". Sevilla.

Vlkova M., Rohousova I., Drahota J., Stanneck D., Kruedewagen E.M., Mencke N., Otranto D., Volf P. 2011. Canine antibody response to *Phlebotomus*

perniciosus bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. Plos Neglected Tropical Diseases, 5 (10): e1344.

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.). 2010. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva.

Zhi-Biao X. 1989. Present situation of visceral leishmaniasis in China. Parasitol Today, 5 (7): 224-8.