



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio de la Distribución y Control de Flebotomos
Vectores de *Leishmania infantum* y Prevalencia de
Infección en Mamíferos Silvestres en la
Región de Murcia

D. José Risueño Iranzo
2018

A Francisca Irazo Guillen, mi tía.

Concretamente, a los rescoldos de una mujer humilde y llena de fe.

"Creo que una hoja de hierba no es menos que el trabajo realizado por las estrellas, y que la hormiga es igualmente perfecta, y un grano de arena, y el huevo de un zorzal, y que la rana de San Antonio es una obra maestra entre las más grandes, y que las zarzamoras podrían adornar los salones del cielo, y que la articulación menor de mi mano puede humillar a todas las máquinas"

Walt Whitman *Leaves of Grass* (1885)

"Some people can read War and Peace and come away thinking it's a simple adventure story. Others can read the ingredients on a chewing gum wrapper and unlock the secrets of the universe"

Lex Luthor, *Superman*, Richard Donner (1978)

AGRADECIMIENTOS

Durante el transcurso de la tesis doctoral han pasado personas que, sin duda, han hecho posible que este estudio se lleve a cabo y, por otra parte, otras que me han permitido plasmar de uno u otro modo los conocimientos adquiridos. Por ello, no quepa duda que se merecen la expresión de mi total gratitud ya que de algún u otro modo han dado vida a lo que se refleja tanto en mi como en lo que se expone a continuación, a todas ellas, muchas gracias.

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud hacia mis directores, el Dr. D. Eduardo Berriatua Fernández de Larrea y la Dra. Dña. M^a Elena Goyena Salgado, por depositar su confianza en mí a la hora de realizar cualquier trabajo, estar en todo momento presentes, por el ánimo y el esfuerzo que, a veces, les supone dedicarme su tiempo y por hacerme demostrar que el afán hacia las cosas es, en parte, algo que con el tiempo se valora y tiene su recompensa. Gracias por vuestra lucha diaria, fuerza e interés.

Seguidamente y con mucho cariño, al resto del profesorado del departamento entre los que destacan la Dra. Dña. M^a del Rocío Ruiz de Ybañez por su apoyo, simpatía y paciencia, el Dr. D. Carlos Martínez-Carrasco Pleite por estar presente la mayoría del tiempo y prestármelo en cuanto me ha sido necesario y la Dra. Dña. Juana María Ortiz Sánchez por su confianza e interés. A todos vosotros, muchísimas gracias por el apego hacia lo desarrollado durante este trabajo, en especial énfasis sobre el terreno personal y por haber formado parte de mi vida universitaria, Máster y tesis doctoral.

Quiero agradecer también a todos los miembros del proyecto VectorNet y a la acción COST, que ha contribuido al desarrollo de mi carrera profesional haciendo posible mi estancia en Praga (República Checa) donde recibí instrucción por parte de la Dra. Dña. Tatiana Spitzova, el Dr. D. Vit Dvorak y el profesor Pter Volf sintiéndome afortunado de estar en tan buenas manos y con tan buenos profesionales.

Durante una breve, pero intensa, estancia en el Instituto de Salud Carlos III de Madrid tuve la suerte de conocer al profesor Ricardo Molina Moreno y a la Dr. Inés Elena Martín Martín del laboratorio de Entomología Médica que me ofrecieron su ayuda y comenzaron captar mi interés en parte del tema que se desarrolla en esta tesis. Más breve aun fueron los dos días que pase junto a mi compañera Clara en Granada, donde pudimos analizar y adquirir destreza en técnicas moleculares de la mano de Manuel Carlos López López y su técnico de laboratorio Dña. Almudena en el instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, gracias a ellos por su tiempo prestado de manera desinteresada.

Hablando pues de compañeros, a Clara Muñoz Hernández y a la más reciente incorporada María Ortuño Gil a quien les deseo toda la suerte posible en sus trabajos y doy las gracias por todo el tiempo que han dedicado al mío, el que han estado conmigo en los laboratorios y han llevado de la mejor manera posible mi forma de ser. Por parte del departamento quiero mencionar al técnico de laboratorio Dña. Encarnación Nieto Berruezo, cuyo paso marco un antes y un después para mí y su compañía llenaba de alegría el laboratorio. Además, quiero agradecer la compañía y trabajo de Dña. Irene Arcenillas Hernández y D. Moisés González Juan que han participado de manera activa en parte de mi tesis.

Los datos de esta tesis están representados por un compendio de tablas y figuras entre las que destacan los mapas elaborados por el Dr. D. Pedro Pérez-Cutillas, investigador contratado en el CEBAS-CSIC de la Universidad de Murcia. Gracias Pedro, por darle vida al contenido de esta tesis de una manera más gráfica y clara.

Gracias al estudio entomológico pude recorrerme gran parte de la Región de Murcia con mis compañeros y amigos conociendo a ganaderos, veterinarios y cazadores que nos abrieron las puertas para poder realizar sin ningún impedimento las tareas dentro de sus establos y rehalas de perros, a todos ellos, gracias por confiar en nosotros y poner vuestros establecimientos en pro de la realización de ciencia.

La mayor parte de mi vida la he pasado rodeado de amistades que, en mayor o menor medida, me han permitido llegar a donde estoy y han hecho de mi ese puzle tan complejo como soy yo mismo. Entre ellos encontramos a amigos de infancia y adolescencia como Laura Martí Serer, Sandra Velasco Mínguez, Carlos Collado Calvo y M^a Luisa Siurana Tomás que desde Valencia me recuerdan que están siempre para cuando les necesite y los más cercanos como Manuel Molina Marín, Gemma López Sánchez, Francisco José Martínez Rondan y Jose M^a Martínez Ayala que además han participado en mi vida diaria y me han ayudado en todos y cada uno de mis problemas o tareas sin pedir nada a cambio, gracias por vuestra paciencia infinita en la convivencia, por escuchar mis disertaciones y por las terapias grupales.

Por último, mi familia, que cariñosamente me apodan como el agujero negro, ellos que siempre están ahí, me soportan y me han permitido llegar a donde estoy. Recordarles que dentro de poco espero que se inviertan las tornas y poder ayudarles lo máximo posible.

ÍNDICE

1. SUMMARY	¡Error! Marcador no definido.
2. INTRODUCCIÓN	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. La leishmaniosis, una enfermedad cosmopolita	11
3.2. Los flebotomos, insectos vectores de <i>Leishmania</i> spp.	13
3.2.1. Origen y clasificación taxonómica	13
3.2.2. Anatomía de los flebotomos	17
3.2.3. Características morfológicas para la identificación de los flebotomos	22
3.2.4. El ciclo de vida, biología y etología de los flebotomos	26
3.3. Métodos de captura de flebotomos	31
3.3.1. Muestreo de ejemplares adultos	31
3.3.2. Recogida de huevos y ejemplares inmaduros	35
3.4. La Leishmaniosis por <i>L. infantum</i> en la Cuenca mediterránea	36
3.4.1. El ciclo de infección de <i>Leishmania infantum</i>	36
3.4.2. La Leishmaniosis canina (LCan), una enfermedad inmunológica y clínicamente variable	41
3.4.3. El perro y otros mamíferos domésticos y silvestres como reservorio de <i>L. infantum</i>	46
3.4.4. Estudios de caracterización de cepas de <i>L. infantum</i> en fauna silvestre y otras especies	51
3.5. Distribución espacial y temporal de los flebotomos y la leishmaniosis en España	53
3.6. Factores que condicionan la distribución espacio-temporal de los flebotomos y la leishmaniosis	58
3.7. Fenología y actividad diaria de los flebotomos y estacionalidad de la leishmaniosis en España	62
3.8. Control de la Leishmaniosis por <i>L. infantum</i> en la Cuenca Mediterránea	65
3.8.1. Empleo de insecticidas con actividad residual	66
3.8.2. Inmunoprofilaxis	68

3.8.3.	Otras medidas de control.....	70
3.9.	Detección de anticuerpos frente a antígenos salivares de los flebotomos para estimar la exposición a flebotomos y eficacia de tratamientos insecticidas.....	70
3.9.1.	Volumen, composición y función hemostática de la saliva	70
3.9.2.	Respuesta inmunológica frente a la saliva de flebotomo por parte del hospedador	72
3.9.3.	La saliva como marcador de exposición, una herramienta de control	76
4.	OBJETIVOS.....	79
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	82
5.1.	Estudio de la abundancia y distribución de flebotomos en el ámbito rural de la Región de Murcia 83	
5.1.1.	Área de estudio: <i>La Comunidad Autónoma</i> de la Región de Murcia.....	83
5.1.2.	Diseño experimental del estudio	87
5.1.3.	Montaje e identificación de flebotomos.....	89
5.1.4.	Datos medioambientales.....	90
5.1.5.	Análisis estadístico de la relación entre la abundancia de flebotomos y el medio ambiente.....	92
5.2.	Estudio de la prevalencia de <i>L. infantum</i> en fauna silvestre en el sureste de España.....	93
5.2.1.	Población de estudio	93
5.2.2.	Purificación de ácidos nucleicos de las muestras de fauna silvestre y estimación de la cantidad y calidad obtenida.....	94
5.2.3.	Detección de secuencias de <i>L. infantum</i> en fauna silvestre mediante PCR a tiempo real	95
5.2.4.	Datos medioambientales y análisis estadístico de la relación entre la infección por <i>L. infantum</i> y variables de los animales y el medio ambiente.....	96
5.3.	Estudio longitudinal de anticuerpos frente a la saliva de los flebotomos en perros tratados con insecticida	97
5.3.1.	Diseño y población del estudio.....	97
5.3.2.	Diagnóstico de <i>L. infantum</i> y estado de infección de los animales	98
5.3.3.	Abundancia y especies de flebotomos en el lugar del estudio	99
5.3.4.	Obtención de antígenos salivares de flebotomos.....	99

5.3.5.	Western blot para la detección de proteínas inmunogénicas específicas.....	101
5.3.6.	ELISA para determinar los niveles de anticuerpos.....	102
5.3.7.	Análisis de la distribución de anticuerpos ELISA.....	103
6.	RESULTADOS	105
6.1.	Estudio de la abundancia y distribución de flebotomos en el ámbito rural de la Región de Murcia	106
6.1.1.	Abundancia y distribución geográfica de flebotomos según el tipo de trampas	106
6.1.2.	Frecuencia de especies y géneros de flebotomos según las zonas y tipo de trampas	109
6.1.3.	Distribución estacional de <i>P. perniciosus</i> en trampas de los CDC y relación bivariante con la temperatura y humedad relativa en el interior de las dependencias.....	109
6.1.4.	Relación bivariante entre la abundancia de <i>P. perniciosus</i> en las trampas CDC y la temperatura y humedad relativa exterior, precipitación y velocidad del viento.....	114
6.1.5.	Relación bivariante entre la abundancia de <i>P. perniciosus</i> en las trampas CDC y el uso de la tierra, el suelo y los tipos de suelo	116
6.1.6.	Relación bivariante entre la abundancia de <i>P. perniciosus</i> en trampas CDC, su distancia a superficies y planas y las características de los edificios, y los animales y su manejo	120
6.1.7.	Relación multivariante entre la abundancia de <i>P. perniciosus</i> y las variables ambientales estudiadas.....	125
6.2.	Estudio de la prevalencia de infección de <i>L. infantum</i> en fauna silvestre del sureste de España.....	127
6.2.1.	Porcentaje de animales rtPCR positivos y distribución de los valores de Ct.....	127
6.3.	Relación entre la positividad a la PCR y las variables explicativas	129
6.4.	Estudio longitudinal de anticuerpos frente a la saliva de los flebotomos en perros tratados con insecticida	133
6.4.1.	Western blots de las proteínas salivares de <i>P. papatasi</i> y <i>P. perniciosus</i>	133
6.4.2.	Densidad óptica de anticuerpos ELISA frente a las proteínas salivares de <i>P. papatasi</i> y <i>P. perniciosus</i>	134
6.4.3.	Porcentaje de perros positivos a las pruebas ELISA frente a las proteínas salivares de <i>P. papatasi</i> y <i>P. perniciosus</i>	137
6.4.4.	Relación multivariable entre los LODs ELISA y el tiempo, edad y sexo	141
7.	DISCUSIÓN.....	144

7.1. Estudio de la abundancia y distribución de flebotomos en el ámbito rural de la Región de Murcia	145
7.2. Estudio de la prevalencia de <i>L. infantum</i> en fauna silvestre en el sureste de España	149
7.3. Estudio longitudinal de anticuerpos frente a la saliva de los flebotomos en perros tratados con insecticida	152
8. CONCLUSIONES.....	157
9. CONCLUSIONS	160
10. BIBLIOGRAFÍA	164

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribucion geográfica de varias especies de *Leishmania* spp (L); flebotomos (S) y reservorios animales (R) en el Viejo y Nuevo Mundo. Fuente: Akhoundi et al. (2016) y modificada por Risueño Iranzo, J.....16
- Figura 2.** Dibujo de un flebotomo. Fuente: cuaderno del Dr. Shabaan El-Hossary (2006) y modificado por Risueño Iranzo J.17
- Figura 3.** Aparato salivar de un flebotomo. En color verde quedan remarcadas la glándula salivar, conducto salivar común y la bomba salivar. Fuente: Jobling (1978) y Modificada por Martín-Martín I.....19
- Figura 4.** Detalle de las glándulas salivares de *P. papatasi*. Escala en mm. Fuente: Jobling (1978). 19
- Figura 5.** Abdomen terminal de hembra de *P. papatasi* desde el tergito (tg) y esternito (stn) n°7 hasta la zona más caudal y espermateca con: a) cabeza b) cuello c) cuerpo y d) conductos espermáticos. Fuente: Theodor (1958) y Jobling (1978), modificado por Risueño Iranzo J.20
- Figura 6.** Abdomen terminal de macho de *P. papatasi* desde el tergito (tg) y esternito (stn) n°7 hasta la zona más caudal donde se observa la genitalia externa completa. Fuente: Jobling (1978), modificado por Risueño Iranzo J.21
- Figura 7.** Cabeza y cibario armado de la especie *Sergentomyia minuta* de el estudio entomológico realizado en la CARM y realizada por Risueño Iranzo, J.23
- Figura 8.** Morfología alar del flebotomo. Fuente: cuaderno del Dr. Shabaan El-Hossary (2006) y modificado por Risueño Iranzo J.25
- Figura 9.** Fases del ciclo biológico del flebotomo. Fuente: WHO (2010) y modificado por Risueño Iranzo, J.....26
- Figura 10.** Diferentes estadios dentro del ciclo de *Lutzomyia diabolica*. A) Huevos, Señadando el punto de ruptura B) Larva I, la flecha apunta a las dos setas caudales C) Larva II, la flecha apunta a las cuatro setas caudales D) Larva III E) Larva IV, la flecha apunta a la placa anal dorsal F) Pupa del flebotomo, quedando señalado al 4° exuvio en la parte mas caudal del pupario. Fuente: Lawyer et al. (2017) y modificado por Risueño Iranzo J.....28
- Figura 11.** Ciclo de *leishmania infantum*. En la Península Ibérica la enfermedad se transmite por *P. perniciosus* y *P. ariasi*. El flebotomo ingiere sangre del hospedador mamífero infectado y los amastigotes se liberan dentro de su intestino (A) donde se transformarán a promastigotes y se dividirán por fisión binaria (B,C). Posteriormente migrarán hacia la válvula faríngea (D) y el flebotomo infectado eliminará los promastigotes a la hora de alimentarse (E). Los promastigotes

metacíclicos invadirán macrófagos, granulocitos o serán fagocitados(G) donde se transformarán en amastigotes, se dividirán e infectarán nuevos macrófagos (H,I,J).37

Figura 12. Ciclo biológico de *Leishmania* dentro de un vector, que ilustra la secuencia y el desarrollo morfológico de diferentes formas de promastigotes a lo largo del tracto digestivo del flebotomo. Fuente: Kamhawi (2006) y modificado por Bravo-Barriga, D. y Risueño Irazo, J.....38

Figura 13. Signos clínicos descritos en la LCan. A) Epixtasis B) Alopecia exfoliativa periorcular y blefaritis C) Conjuntivitis purulenta y blefaritis D) Onicogriposis E) Dermatitis papular F) Alopecia exfoliativa en las patas traseras y linfadenomegalia del poplíteo G) Caquexia H) Lesiones eritematosas ulcerativas en la superficie plantar de la pata y entre almohadillas plantares I) Lesiones crateriformes nodulares que rodean el hocico. Fuente: Solano-Gallego et al. (2011) y modificado por Risueño Irazo, J.44

Figura 14. Distribución de las especies de flebotomos descritas en España. Fuente: Gil-Collado et al. (1989), Gallego-Berenguer et al. (1992), Morales-Yuste (2012); Barón (2011); Alcover et al. (2014) y Morillas et al. (2017). Mapa tomado de Morales-Yuste (2012) y modificado por Bravo-Barriga, D.55

Figura 15. Prevalencia de *Leishmania infantum* en perros en España. Fuente y diseño de Bravo-Barriga, D. (2017) con los datos revisados por: Gálvez (2011); Morales-Yuste, (2012); Miró et al. (2012), Hernández Martínez (2016). *Solano-Gallego et al. (2006).58

Figura 16. Fenología general de los flebotomos en el Sureste español. Fuente: Martínez-Ortega y Conesa-Gallego (1987) y modificada por Risueño Irazo, J.64

Figura 17. Efectos de la saliva de *L. longipalpis* sobre el sistema inmune de un hospedador vertebrado. 1) Infiltración de células inflamatorias. 2) Producción de anticuerpos frente a las proteínas salivales.3) Formación de inmunocomplejos en la fase temprana. 4) Modulación de la liberación de citoquinas y producción de moléculas coestimuladoras por las células presentadoras de antígeno. Fuente: Andrade et al. (2007) y modificada por Martín-Martín (2014)73

Figura 18. Localización de la CARM y Distribución de las 5 zonas biogeográficas tradicionalmente reconocidas en base a su vegetación, orografía y climatología.86

Figura 19. Localización de cada punto de muestreo perteneciente al estudio entomológico87

Figura 20. Ejemplos de trampas luminosas (A, B y C) y adhesivas (D, E y F) colocadas durante el estudio entomológico en las distintas zonas de muestreo de la CARM.....88

Figura 21. Imagen obtenida por microscopía óptica de las genitalias de las especies vectoras de *L. infantum* en la Península Ibérica. A y B) machos de *P. ariasi* y *P. perniciosus* C y D) espermatecas de las hembras *P. perniciosus* y *P. ariasi*.90

Figura 22. Detalle de la cabeza de <i>P. perniciosus</i> con la flecha apuntando a las glándulas salivares observadas bajo el estereomicroscopio (20x).....	100
Figura 23. distribución estacional de los flebotomos en trampas luminosas por meses en base a la temperatura interior media y la humedad relativa (HR) medidas durante el intervalo en el que se colocaron las trampas.....	112
Figura 24. Temperatura máxima absoluta media, humedad y velocidad del viento en las estaciones meteorológicas más cercanas a los sitios de estudio.	113
Figura 25. Ejemplos de las distintas instalaciones donde se colocaron las trampas: A) instalación de Beagles perteneciente a la Granja de Veterinaria de entre 2-20 años de antigüedad B) Rehala de perros en Yecla, Instalación de ladrillo enlucido de entre 2-20 años de antigüedad C) Establo de ovejas de piedra sin enlucir con más de 100 años de antigüedad situada en Archivel D) Perrera de ladrillo enlucido de entre 2-20 años de antigüedad situada en Campos de Rio E) Establo de ovejas de ladrillo enlucido de entre 30-50 años de antigüedad situado en Archivel.....	120
Figura 26. Distribución de animales silvestres positivos y negativos a la infección de <i>Leishmania infantum</i>	129
Figura 27. Análisis de Western blot del suero canino para la saliva de la especie <i>P. papatasi</i> (SGH) y la proteína recombinante SP32 (A) y la saliva completa de <i>P. perniciosus</i> y la proteína amarilla SP03B (B). (#) mezcla de sueros caninos; (+) Sueros caninos positivos a la técnica ELISA anti-saliva; (*) suero canino al inicio del estudio (-) suero de perros negativos.	133
Figura 28. Distribución temporal del porcentaje (95% CI) de perros seropositivos a la proteína recombinante de <i>P. papatasi</i> (rSP32) y el SGH según los grupos de perros expuestos AP14, JU14 y MA15 (los perros se incorporaron en el estudio: abril de 2014, junio de 2014 y marzo de 2015, respectivamente).....	139
Figura 29. Distribución temporal del porcentaje (95% CI) de perros seropositivos a la proteína recombinante de <i>P. perniciosus</i> (rSP03) y el SGH según los grupos de perros expuestos AP14, JU14 y MA15 (los perros se incorporaron en el estudio: abril de 2014, junio de 2014 y marzo de 2015, respectivamente).....	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de trampas de CDC con flebotomos (trampas positivas) y abundancia de flebotomos en trampas positivas en perreras y establos de ovejas en la CARM durante 2015. * Altitud sobre el nivel del mar (s. n. m.).....	107
Tabla 2. Abundancia absoluta y relativa de especies de flebotomos en base a el tipo de trampa, la zona, el sexo, las instalaciones animales y la semana de estudio en la Región de Murcia, sureste de España, en 2015.....	111
Tabla 3. Porcentaje de trampas con flebotomos y abundancia de flebotomos en trampas CDC positivas según la la humedad relativa y la temperatura en las instalaciones el día en que se recolectaron las trampas	115
Tabla 4. Porcentaje de trampas CDC con <i>P. perniciosus</i> y abundancia en trampas positivas según variables climáticas obtenidas de las estaciones meteorológicas.....	117
Tabla 5. Porcentaje de trampas CDC con <i>P. perniciosus</i> y abundancia en trampas positivas según el uso de la tierra, el suelo y los tipos de suelo.....	119
Tabla 6. Porcentaje de trampas con flebotomos y abundancia de flebotomos en trampas CDC positivas según la posición de la trampa, características estructurales, especies de animales y prácticas de cría.....	122
Tabla 7. Tasas de incidencia de un modelo de Binomialdistribución Negativa de la relación entre los conteos de flebotomos de <i>P. perniciosus</i> de las trampas CDC y la humedad relativa interior combinada (% RH) y la temperatura (T), velocidad máxima del viento de mayo a octubre y edad de construcción.....	125
Tabla 8. Estimaciones de un modelo de distribución Binomial Negativo multinivel en el que se observa la relación entre la abundancia de <i>P. perniciosus</i> en trampas CDC y variables ambientales, incluyendo precipitación de mayo a octubre (I _{la}) y la media de temperatura máxima (T ⁹) y velocidad del viento.....	126
Tabla 9. Porcentaje de <i>L. infantum</i> rtPCR positivos y distribución de medianas de Ct (rango) en carnívoros silvestres, lagomorfos y roedores del sudeste de España entre los años 2013-2017. ...	128
Tabla 10. Estimaciones del modelo de regresión logística multivariable de la relación entre el estado de <i>Lertmania infantum</i> rtPCR y las variables ambientales y las especies animales.....	130
Tabla 11. Prevalencia (rtPCR) de <i>L. infantum</i> (95% CI) en fauna silvestre del Sureste español en base a las variables independientes.....	131

Tabla 12. Prevalencia de *L. infantum* en zorros y conejos en la CARM según la altitud , precipitaciones medias, la humedad relativa, la temperatura y la velocidad máxima del viento de mayo a octubre..... 132

Tabla 13. Distribución temporal de la media (rango) en los LOD de anticuerpos de perro contra las proteínas salivales de *P. papatasi* según el grupo de exposición..... 135

Tabla 14. Distribución temporal de la media (rango) en los LOD de anticuerpos de perro contra las proteínas salivales de *P. perniciosus* según el grupo de exposición..... 136

Tabla 15. Estimaciones de un modelo de regresión lineal de efectos aleatorios de la relación entre los valores de LOD contra los antígenos salivales de *P. papatasi* y *P. perniciosus* en perros APR14 (incorporados en el estudio en abril de 2014).. 142

SUMMARY

Leishmaniosis is a disease of dogs and humans caused by *Leishmania* spp. protozoans, transmitted by hematophagous, Phlebotomine sand flies. Infection is endemic in the warm latitudes of the planet including southern Europe, where the endemic species, *Leishmania infantum* is responsible for Canine Leishmaniosis, one of the most important diseases of dogs, and human Leishmaniosis that affects hundreds of people in Spain alone. Present measures to prevent Leishmaniosis are insufficient and they primarily focus on the use of insecticides with repellent activity on the dog, which is the primary reservoir of the parasite. Although the efficacy of insecticides in experimental conditions is close to 90%, an epidemiological study in Murcia Region (MR) in Spain indicates that it is much lower, because they are not used correctly. This may indicate that dog owners are not fully aware of the risk of sand fly bites, partly because there is no up to date information on sand fly abundance in the region. Another important aspect hampering control is the existence of reservoirs of infection other than the dog. Recent studies using highly sensitive molecular diagnostic techniques have shown that *L. infantum* is able to infect a variety of domestic and sylvatic mammals and that it is quite probable that a sylvatic transmission cycle is in operation and interacts with the domestic cycle maintained by the dog. There is no information about *L. infantum* infection in wildlife in MR.

The overall objective of this thesis is to provide new, useful information about some the later aspects in order to improve the design of Leishmaniosis control programs in MR and other endemic areas. To this effect, studies were carried out to: (i) describe Phlebotomine sand fly abundance and distribution in the main geoclimatic areas of the region, (ii) estimate the prevalence and distribution of Leishmaniosis in wildlife in southeast Spain and (iii) evaluate the possibility of monitoring antibodies in dogs against sand fly salivary proteins as a marker of the repellent efficacy of one of the most popular insecticides in Europe.

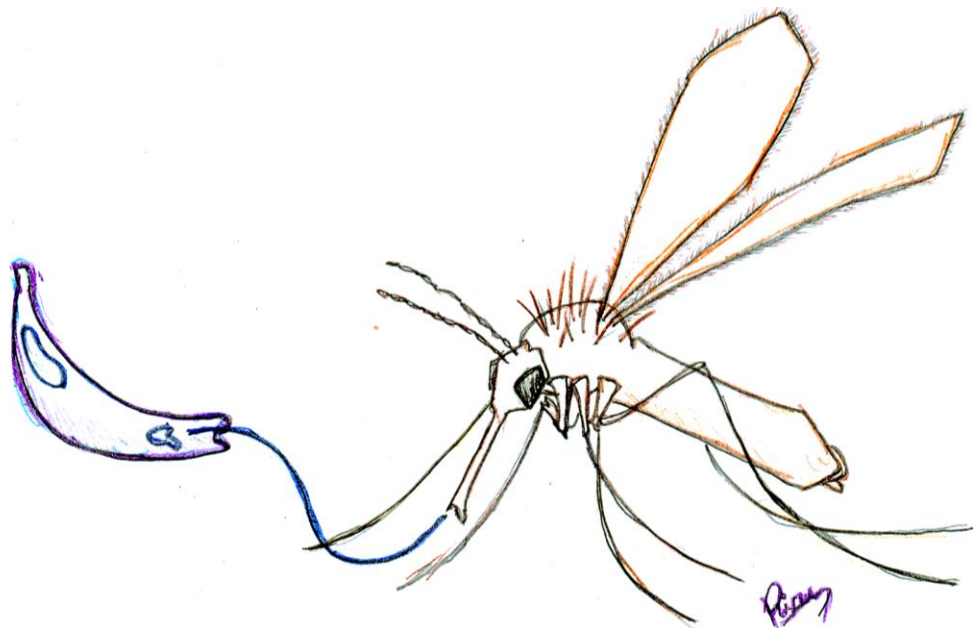
The entomological study of sand flies used a novel sampling method that allowed comparing vector abundance in the five most representative areas of Murcia's climatic and geographical diversity. Sand fly traps, including sticky interception and light attraction traps were placed in 25 sheep farms in the main five areas, between May and July 2015. Temperature, relative humidity (RH) and data from other environmental and animal husbandry variables were recorded to investigate their relationship with vector abundance, using a Geographical Information system (GIS) and negative binomial regression models. A total of 3644 sand flies were captured mostly with light traps and 80% were *Phlebotomus perniciosus*, the main *L. infantum* vector in Spain. Abundance varied between zones and was positively associated to altitude, except in the 500-700 m range where strong winds prevailed, and was highest in July, especially during a 3 day heat wave when RH and wind speed plummeted. Regression models indicated that climate and not land use or soil characteristics have the greatest impact on this species density on a large geographical scale. In contrast, micro-environmental factors such as animal building characteristics and husbandry practices affect sand fly population size on a smaller scale. This information will allow developing sand fly abundance prediction maps, useful to improve the design of sand fly control programs.

The Leishmaniosis study in wildlife investigated *L. infantum* DNA in skin and organs from 202 carnivores, rodents and lagomorphs in southeast Spain, mostly from MR, using a real time PCR test. None of the animals had lesions compatible with Leishmaniosis and the percentage of *L. infantum* PCR-positives (prevalence) was 32%, specifically 45% in foxes, 30% in rabbits and stone martens, 19% in wood mice and 0-100% in other minoritarian species including black rats, badgers, wild cats, wolves, raccoons, genets and hares. Most rabbits were PCR-positive in skin and not in organs and it was the opposite for foxes. Prevalence was lowest in spring following several months of non-exposure to sand flies, and was correlated spatially with *P. perniciosus* distribution and temporally with prevalence in dogs, estimated in previous studies. Genetic analysis of *L. infantum* from foxes, carried out as a parallel study, confirm that the genotype is frequent in the Iberian

Peninsula and Morocco. These results confirm the presence of infection in wildlife in MR and suggest that sylvatic and domestic transmission cycles are closely interconnected, and this should be taken into account towards improving Leishmaniosis control.

Phlebotomus perniciosus and *P. papatasi* salivary gland homogenates and recombinant proteins were used to investigate anti-saliva antibody dynamics in a cohort of 32 experimental dogs treated with the topical insecticide Advantix (Bayer®), following natural exposure to these sand fly species during two years. None of the dogs developed natural *L. infantum* but most had low antibody levels against salivary proteins and the mean antibody optical density (OD) was seasonal, similar to *P. perniciosus* and *P. papatasi* abundance in the area. The study shows for the first time that anti-saliva antibodies are a good marker of exposure to sand flies and that monitoring them allows estimating the efficacy of insecticide treatments in dogs. Furthermore, it confirms that the efficacy of the product tested is below 100% even when administered correctly. Notwithstanding this, the absence of infection and low ODs suggest that the product is useful to prevent infection and controlling Leishmaniosis in the population.

INTRODUCCIÓN



Los dípteros flebotominos o flebotomos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) son insectos hematófagos de las zonas cálidas del planeta incluida la Cuenca Mediterránea, responsables de transmitir mediante la picadura el protozoo difásico *Leishmania spp.* (*Kinetoplasta*, familia *Trypanosomatidae*), agente causal de la leishmaniosis canina (LCan) y humana (LHum). Existen más 800 especies de flebotomos en el mundo y en España se han descrito doce especies, de las cuales solo *Phlebotomus ariasi* y *Phlebotomus perniciosus* tienen actividad vectorial de la única especie endémica en nuestro país, *Leishmania infantum* (Aransay *et al.*, 2004; Ready, 2013). A diferencia de los mosquitos, estos insectos depositan los huevos en zonas terrestres protegidas de la luz solar directa, con humedad relativa alta y abundante materia orgánica para el desarrollo de las fases larvarias. La abundancia de flebotomos adultos suele ser máxima en madrigueras, cuevas, grietas de muros y rocas, y en recovecos de ambientes humanizados (edificios en ruinas, casetas de aperos de labranza, vertederos, etc.), sobre todo si en las proximidades de estos lugares hay animales de los que pueden alimentarse las hembras adultas, que precisan sangre para la maduración de sus ovarios y realizar la oviposición y por lo tanto solamente ellas transmiten *Leishmania spp.* (killick-kendrick y Killick-Kendrick, 1999; Feliciangeli, 2004). Los flebotomos son particularmente abundantes en zonas rurales y periurbanas, y alcanzan elevadas densidades en granjas de ganado y aves (Dancesco y Chadli, 1982; Ximenes *et al.*, 1999; Guernaoui y Boumezzough, 2009; Galvez *et al.*, 2010).

El principal reservorio de *L. infantum* en el ambiente doméstico y la especie más sensible es el perro, en el que la infección puede cursar de forma subclínica o con un amplio espectro de lesiones que causan la muerte en animales no tratados eficazmente (Solano-Gallego *et al.*, 2009). La LCan es una de las enfermedades más importantes en la Cuenca mediterránea, incluida la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM). El impacto de la LHum en nuestro país es significativamente menor (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012; Herrador *et al.*, 2015), y se estima que anualmente en Europa cerca de un millar de personas se ven afectadas por la enfermedad, aunque probablemente hay muchos casos particularmente de formas leves de infección que no llegan a notificarse (Dujardin *et*

al., 2008; Antoniou *et al.*, 2013). Además del perro y las personas, los estudios de infección de *L. infantum* realizados en la última década empleando técnicas de diagnóstico moleculares altamente sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) demuestran que el parásito es capaz de infectar a una amplia variedad de animales domésticos y silvestres, en muchos casos de forma asintomática (Millán *et al.*, 2014).

La Leishmaniosis es una enfermedad emergente en Europa asociada a la expansión del vector hacia latitudes más septentrionales ligada al cambio climático, al aumento del movimiento de animales infectados entre zonas endémicas y libres del parásito y a la actividad humana como por ejemplo a la urbanización de zonas endémicas (Ferroglio *et al.*, 2005; Maroli *et al.* 2008; Poepl *et al.*, 2013; Arce *et al.*, 2013). Concretamente en España, se describe un aumento de la LCan y la presencia de infección en fauna silvestre en el norte, zona tradicionalmente no endémica de Leishmaniosis (Ballart *et al.*, 2012; del Río *et al.*, 2014). Por otro lado, en el sur de Madrid, en el municipio de Fuenlabrada, nos encontramos ante el mayor brote de LHum descrito en Europa, ligado a la sobrepoblación de lagomorfos, fuente de sangre para el vector, en zonas verdes recreativas de una urbanización de reciente construcción (Arce *et al.*, 2013). Más aún, por primera vez se ha detectado la presencia en el sur de Europa de la especie *L. major* causante de la leishmaniosis cutánea en personas en el norte de África, en el flebotomo *Sergentomya minuta* (Campino *et al.*, 2013; Millán *et al.*, 2014).

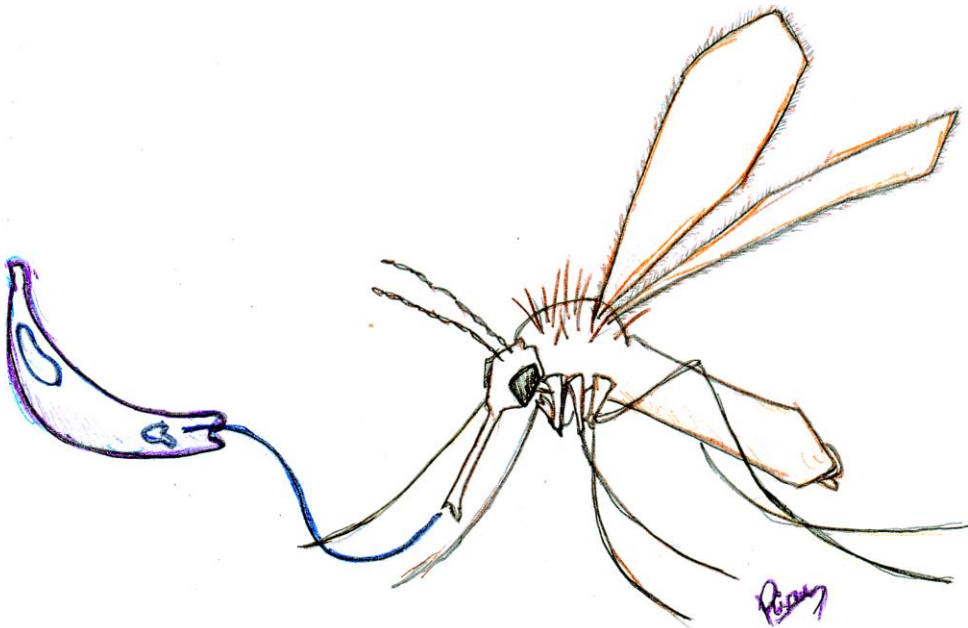
El paradigma en la epidemiología de la leishmaniosis en Europa que considera que los perros son el único reservorio primario de *L. infantum* ha cambiado. Actualmente se piensa que el clásico ciclo epidemiológico perro-flebotomo-humano es solamente una parte de un ciclo de transmisión más amplio en el que participa una amplia red de especies animales que colaboran con el perro en el mantenimiento del parásito en la naturaleza. Se cree que existe un ciclo silvestre de transmisión de *L. infantum* que opera de forma independiente y que interactúa con el ciclo doméstico mantenido por los perros (Quinell y Courtenay, 2009). Sin embargo, el conocimiento del ciclo selvático de *L. infantum* sigue resultando crítico para la ciencia (Gharbi *et al.*, 2015).

El control de la infección por *L. infantum* se basa actualmente en el uso simultáneo de varias medidas incluidas, las dirigidas a evitar la picadura del artrópodo, el tratamiento de los animales y personas enfermas y el empleo de vacunas e inmunomoduladores de eficacia limitada o poco contrastada (Miró *et al.*, 2017). Entre todas ellas, la medida de control que se considera más importante es el empleo de insecticidas con actividad residual en el perro para prevenir la picadura del vector. Sin embargo, la eficacia de esta medida en condiciones naturales no controladas puede ser muy limitada (Goyena *et al.* 2016) y la prevención de esta enfermedad sigue considerándose un desafío.

En la situación en la que nos encontramos parece claro que para mejorar el control de la leishmaniosis es necesario un abordaje holístico que incluya un conocimiento más amplio de los mecanismos de enfermedad, de la epidemiología y entomología de la infección y del potencial de las medidas de control disponibles. En esta tesis doctoral se pretende avanzar en el conocimiento en estas áreas con trabajos realizados en la Región de Murcia, zona endémica de LCan y LHum (de Ybáñez *et al.* 2009, Pérez-Cutillas *et al.*, 2015; Goyena *et al.*, 2016). Por primera vez se han llevado a cabo estudios para: (i) determinar la abundancia de flebotomos en las principales zonas eco-climáticas de la región y cuantificar la relación entre la abundancia del principal vector, *P. perniciosus* y las características medioambientales, (ii) evaluar la actividad repelente de un insecticida en el perro analizando anticuerpos frente a la saliva del vector y (iii) estudiar la infección de *L. infantum* en la fauna silvestre. Una importante limitación a la hora de cuantificar la abundancia de flebotomos en una zona concreta es la ausencia de un método estandarizado de muestreo como el que se propone en esta tesis. Son también escasos los estudios de la relación abundancia de flebotomos y el medioambiente con datos medioambientales precisos y empleando técnicas de análisis estadístico avanzadas. El estudio de anticuerpos salivares en los perros para evaluar la actividad repelente de un insecticida pretende paliar la imposibilidad de cuantificar la tasa de infestación (picaduras) de vectores. Finalmente, con el estudio de la infección en fauna silvestre se espera

mejorar el conocimiento de los ciclos de transmisión de *L. infantum* y la necesidad de considerar estas especies para mejorar el control de la infección.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1.1. La leishmaniosis, una enfermedad cosmopolita

La importancia de los flebotomos se debe en gran medida a que son vectores de agentes patógenos de los animales y el hombre, entre las que encontramos la *Leishmania* spp., *Bartonella bacilliformis* y varios Arbovirus (Phlebovirus y Vesiculovirus) (El-Hossary, 2006; Ready, 2013; Prudhomme *et al.*, 2015). El patógeno de mayor impacto veterinario y de salud pública es *Leishmania* spp. (Otranto *et al.*, 2013). Cerca de 30 especies de *Leishmania* han sido descritas (Fig. 1) de las que unas 20 se consideran responsables de las tres principales formas de la enfermedad en el hombre: la leishmaniosis visceral, cutánea y mucocutánea (Gállego, 2004).

Común a los tripanosomátidos, *L. infantum* es un protozoo flagelado cuya característica diferencial es la posesión un kinetoplasto, estructura rica en ADN localizada en el interior de la única mitocondria. La distribución mundial del protozoo incluye 97 países de 4 continentes (Ready, 2013). Según la OMS, la Leishmaniosis es una de las parasitosis más importantes por su amplia distribución, incidencia y dificultad de control. Los datos de prevalencia indican que hay 12 millones de enfermos y la incidencia asciende a dos millones de casos nuevos anuales. De estos, 1'5 millones corresponden a formas cutáneas y muco-cutáneas y 0'5 millones a las viscerales, siendo la población en riesgo de aproximadamente 350 millones de personas (Murray *et al.*, 2005; OMS, 2010). Sin embargo, los datos oficiales disponibles no son plenamente fehacientes ya que numerosos casos sobre todo de Leishmaniosis cutánea no se declaran y solamente en 40 de los 88 países endémicos la leishmaniosis es una enfermedad de declaración obligatoria (Alvar *et al.*, 2012).

Entre las especies de *Leishmania*, *L. infantum* es la de mayor distribución geográfica y es endémica en los países de la cuenca Mediterránea, Oriente Medio, Asia Central y del Sur. Su homóloga en América Central y del Sur es *L. chagasi*, que correspondería a *L. infantum* introducida por los colonizadores europeos (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Además, en Europa se han descrito casos de LHum causada por *L. donovani* en la isla de

Chipre, (Dokianakis *et al.*, 2016). En España, la Leishmaniosis por *L. infantum* es una zoonosis endémica presente en la mayor parte del territorio peninsular y en las Islas Baleares y causante tanto en las formas viscerales como cutáneas (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012). A pesar de que se han registrado casos de leishmaniosis humana en todas las regiones españolas, hasta hace poco en muchas de ellas no era una enfermedad de declaración obligatoria (Amela *et al.*, 2012). Sin embargo, el 1 de enero de 2014 entró en vigor una nueva Orden que modifica el Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, que obliga a declarar los casos de leishmaniosis en todas las comunidades autónomas. En España la incidencia de leishmaniosis aumentó progresivamente desde mediados de la década de 1980 hasta finales de los 90 principalmente debido a la pandemia producida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Herrador *et al.*, 2015). Desde el año 1996 hasta el 2011, la incidencia media anual notificada fue 0,45 casos por cada 100.000 habitantes (Amela *et al.*, 2012). El número de casos ha aumentado significativamente desde entonces debido al antes citado brote de LHum en Fuenlabrada, donde la incidencia llegó a ser de 45,17 casos/100.000 habitantes (González *et al.*, 2017a). En la Región de Murcia entre 2000 y 2010 se notificaron 82 casos y estudios actuales realizados por Hernández-Torres *et al.* (2015) asocian un aumento de la leishmaniosis visceral humana entre los años 1997-2013 asociado a la emigración.

El amplio espectro clínico de la leishmaniosis se asocia a la amplia variedad de especies existentes, con distinta especificidad por los tejidos del hospedador y a la respuesta inmune que este desarrolla frente al parásito. Las especies *L. infantum*/*L. chagasi* y *L. donovani* son los agentes causales de la Leishmaniosis Visceral (LV), siendo ésta última especie un parásito antroponótico ya que su hospedador principal es el hombre. Sintomatológicamente se caracteriza por la aparición de fiebre, pérdida de peso, y afección de los órganos linfoides con hepatomegalia y esplenomegalia, precedido por un periodo de incubación de entre 10 días o un año. La leishmaniosis antroponótica se distribuye en regiones de Asia y África Oriental, mientras que como se ha señalado anteriormente la LV zoonótica por *L. infantum* presenta una distribución más amplia.

La leishmaniosis cutánea (LC) en personas en el Viejo Mundo (VM) está causada por las especies *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*. Está presente en 82 países, con una incidencia de 1,5 millones de casos por año (Oliveira *et al.*, 2011). Las especies *L. infantum* y *L. donovani* pueden manifestarse exclusivamente con lesiones cutáneas (Giavedoni *et al.*, 2015; Al-Salem *et al.*, 2016). Además, en zonas en donde *L. donovani* es endémica en el subcontinente indio, es frecuente la leishmaniosis dérmica post kala-azar (PKDL), con aparición de úlceras en la piel similares a las causadas por *L. tropica*, *L. major* o *L. aethiopica* (Reithinger *et al.*, 2007; Bari *et al.*, 2008; de Vries *et al.*, 2015).

En la leishmaniosis mucocutánea (LMC) en las personas se ven afectadas las mucosas nasal y orofaríngea por infección con las especies del subgénero *Viannia*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Existen casos excepcionales de afecciones graves de las mucosas causadas por *L. donovani* en India (Daulatabad *et al.*, 2005) y *L. infantum* en España (Giavedoni *et al.*, 2015; Freitas-Martínez *et al.*, 2015). Es una forma de afección de la Leishmaniosis que es desfigurante y la ulceración de la mucosa nasal acaba afectando el tabique nasal y en algunos casos, los labios, las mejillas, el paladar blando, la faringe y la laringe. Los casos más graves se asocian a *L. braziliensis* y es una enfermedad difícil de tratar (Sundar y Chakravarty, 2015).

1.2. Los flebotomos, insectos vectores de *Leishmania* spp.

1.2.1. Origen y clasificación taxonómica

Los flebotomos, vectores de *Leishmania* spp., son dípteros nematóceros pertenecientes a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*. La distribución de estos dípteros es muy amplia encontrándose en las regiones tropicales, subtropicales y templadas, incluyendo el sur de Europa, Asia, África, Australia y América. Su distribución se extiende hacia el norte hasta la latitud 50°N en el sudoeste de Canadá y justo por debajo de esta latitud en el norte de Francia y Mongolia. La distribución en el sur llega

hasta la latitud 40°S, encontrándose ausentes en Nueva Zelanda y las islas del Pacífico. Su distribución altitudinal va desde el nivel del mar hasta los 3.300 metros sobre el nivel del mar en Afganistán (killick-kendrick, 1990a; Maroli *et al.*, 2013). En el VM, el género *Sergentomyia* y *Phlebotomus* son los que presentan una distribución geográfica más amplia. El género *Phlebotomus* es paleártico, a diferencia de las especies del género *Sergentomyia* que se encuentran implantadas sobretudo en África subsahariana y en Asia meridional, aunque también en el Sur de Europa y Oceanía (Léger y Depaquit, 2002). *Sergentomyia* está formado por especies preferentemente herpetófilas y son transmisoras de *Sauroleishmania* que infecta a los reptiles. (killick-kendrick y Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 2002). Estudios recientes plantean la posibilidad de que algunas especies del género *Sergentomyia* puedan transmitir especies causantes de leishmaniosis cutánea en humanos (Berdjane-Brouk *et al.*, 2012).

El origen de estos dípteros es anterior a unos 120 millones de años y la evolución desde ese momento probablemente fue impulsada por los principales eventos tectónicos y cambios climáticos que afectaron a la Pangea (Dujarin *et al.*, 1999). La primera vez que se empleó el término "flebotomino" fue por un naturalista italiano Filippo Bonanni, en el año 1691 en cuanto a que la primera descripción fue realizada por el naturalista Scopoli, bajo el nombre de *Bibio papatasi* (Lewis, 1982).

Constituyen un grupo homogéneo y monofilético, cuya posición taxonómica ha sido objeto de controversia (Maroli *et al.*, 2013) siendo su clasificación confusa y encontrándose en constante cambio. La posición de las especies del VM está más aceptada que la de aquellas que pertenecen al NM. Para estas últimas la revisión más aceptada es la de Galati 2003 (Maroli *et al.*, 2013). En el pasado, las técnicas isoenzimáticas y de cromatografía de gases de los hidrocarburos cuticulares eran de gran ayuda para la identificación de especies morfológicamente indistinguibles (Dujardin *et al.*, 1999; Boussaa *et al.*, 2008). Actualmente, se están poniendo en práctica el uso de nuevas técnicas de biología molecular que permiten medir las diferencias genéticas y evolutivas de las poblaciones estudiadas (Kumar *et al.*, 2012). Las técnicas moleculares permiten un

grado de diferenciación a nivel de sub-especie que no es posible con las morfológicas sin embargo, su validez y facilidad de interpretación puede verse afectada por la extensa variabilidad genética de algunos locus objetivo (Dvorak *et al.*, 2011). Otra técnica de especiación de flebotomos y otros organismos altamente específica es la ionización MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) usada mediante espectrometría de masas. Se basa en la caracterización del perfil proteico específico de cada especie y cada vez se emplea en más laboratorios para la identificación de especies de flebotomos (Mathis *et al.*, 2015). Las técnicas moleculares son de gran ayuda para la clarificación de casos dudosos en la identificación morfológica, sin embargo, ésta última es la técnica más ampliamente utilizada por los entomólogos y es altamente válida en manos de especialistas (Depaquit, 2014).

Hasta la fecha actual existen alrededor de 800 especies de flebotomos (Fig. 1) en el mundo de los cuales cerca de 400 se encuentran en el NM agrupados en tres géneros: *Brumptomyia*, *Warileya* y *Lutzomyia*. Respecto al VM, los flebotomos se agrupan, de acuerdo a una clasificación ampliamente aceptada, en los géneros *Sergentomyia*, *Phlebotomus* y *Chinius*. Generalmente, la clasificación aceptada es la realizada por Lewis, quien propuso en 1997 una clasificación estable de la subfamilia *Phlebotominae* basada en criterios de importancia médica y conceptos biogeográficos. Solamente entre un 10-15% de las especies actúan como vectores, de las cuales 30 son consideradas de importancia en la salud pública. En el NM todas estas especies pertenecen al género *Lutzomyia*, dividido en 25 subgéneros y grupos de especies, mientras que en el VM al género *Phlebotomus*, dividido en 12 subgéneros (killick-kendrick y Killick-Kendrick., 1999).

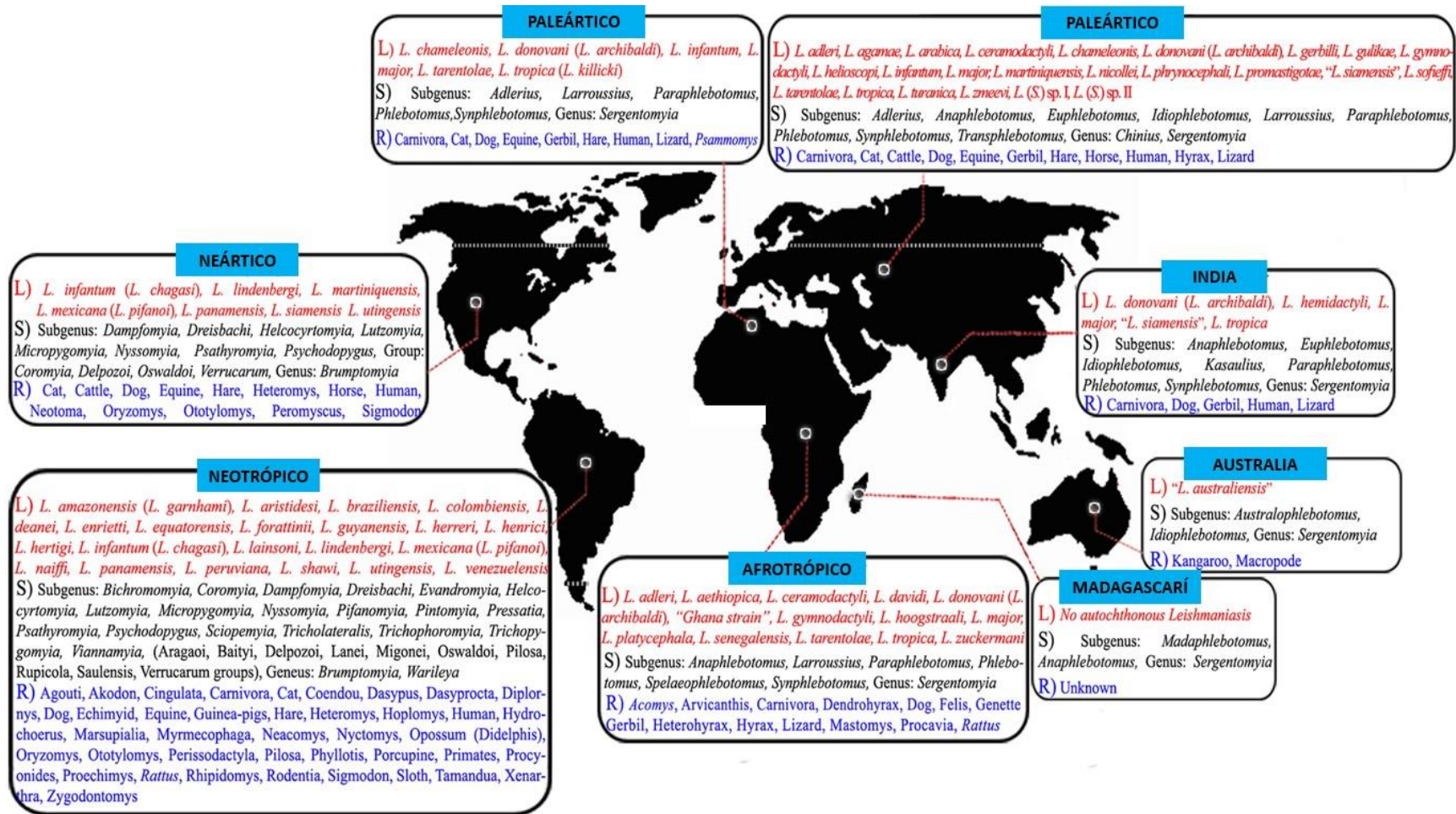


Figura 1. Distribucion geográfica de varias especies de *Leishmania* spp (L); flebotomos (S) y reservorios animales (R) en el Viejo y Nuevo Mundo. Fuente: Akhoundi *et al.* (2016) y modificada por Risueño Irazzo, J.

1.2.2. Anatomía de los flebotomos

Los flebotomos son dípteros de pequeño tamaño, entre 1 y 4 mm de longitud y tienen un aspecto muy característico que permite diferenciarlos del resto de insectos de forma rápida, incluso a simple vista. El cuerpo es generalmente de color pálido con tonalidades amarillentas, grisáceas y marronáceas, aunque algunas especies son prácticamente negras, y está cubierto de finas sedas lo que les confiere un aspecto muy peludo. El cuerpo presenta una estructura general, como todos los insectos hexápodos, constituida por tres unidades funcionales: cabeza, tórax y abdomen (fig. 2) (Gallego-Berenguer,2006).

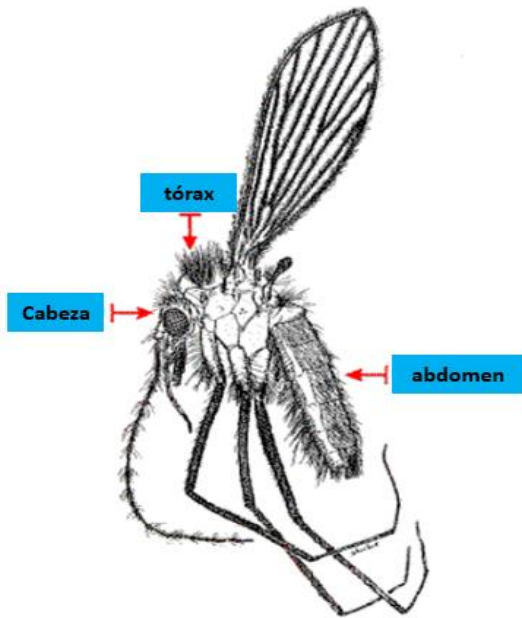


Figura 2. Dibujo de un flebotomo. Fuente: cuaderno del Dr. Shabaan El-Hossary (2006) y modificado por Risueño Iranzo J.

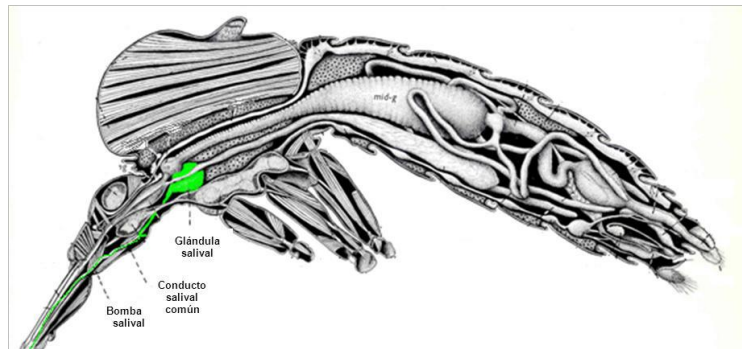
La **cabeza** es elongada con cada una de sus partes apuntando hacia abajo. Se encuentra constituida en su mayor parte por una estructura quitinosa capsular o epicráneo y dos ojos grandes multifacetados. El epicráneo se divide en 3 partes: occipucio, vértice y frente. Esta última se prolonga hasta el clípeo, donde se encuentra el aparato picador-chupador o probóscide. En hembras, los apéndices que forman la probóscide son dobles y está formado por seis piezas bucales entre las que se encuentran las dos

mandíbulas dentadas, las maxilas, la hipofaringe y labro-epifaringe, todas ellas protegidas ventralmente por el labium, y cuyo conjunto se denomina fascículo. En cambio, los machos carecen de mandíbulas y las demás estructuras presentan un tamaño reducido. De la base de las maxilas emergen los palpos, apéndices segmentados en 7 pequeñas partes. En la cara ventral del tercer segmento se encuentra el órgano de Newstead, formado por un bulbo en el que se sitúa un mechón de pelos cortos y gruesos con gran actividad quimiorreceptora, muy útil durante la alimentación. El par de antenas peludas son similares en ambos sexos y se componen de 16 segmentos, llamados artejos. El primer segmento (A1) o "scape" tiene forma de anillo y está unido a la superficie dorsal de la cabeza, entre los ojos, el segundo segmento o pedicelo (A2) tiene forma de globo y los siguientes 14 segmentos se denominan flagelómeros subcilíndricos. El flagelómero más largo es siempre el primero. Dentro de la cabeza encontramos algunos caracteres taxonómicos importantes, especialmente la faringe, las antenas y el cibario, estructura interna que se encuentra entre la probóscide y la faringe (Abonnenc, 1972; Léger y Depaquit, 1999).

El **tórax** se encuentra compuesto por el protórax, mesotórax y metatórax. Se eleva por encima de la cabeza, Su aspecto es giboso y peludo y en él se presentan tres pares de patas muy largas y finas. El protórax es el más pequeño en comparación a los demás segmentos encontrándose parcialmente cubierto por el mesotórax cuyo aspecto está más desarrollado. En el mesotórax se presentan dos alas lanceoladas peludas, de venación característica y cuya longitud es casi igual a la del cuerpo. En posición de reposo forman una "V" en un ángulo de 45° con el eje corporal sobre el tórax. 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, 1982).

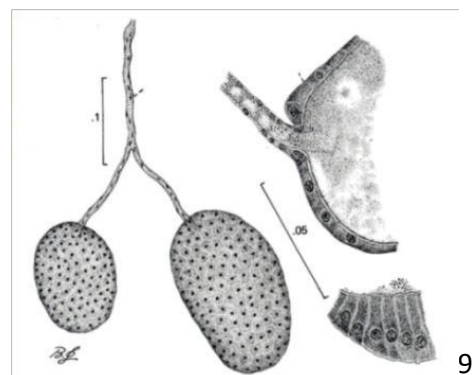
El **aparato salival de los flebotomos** es de tipo tubular y consta de dos glándulas salivales, dos conductos salivales, que convergen en un conducto salival común, y una bomba salival que fuerza la salida de la saliva a través del estrecho canal esclerotizado de longitud similar a la probóscide (Fig 3.). Se conduce así la saliva hacia la herida a través de la hipofaringe (Adler y Theodor, 1926). Los lóbulos salivales se localizan a cada lado de la parte más ventral del tórax y están constituidos por una capa unicelular de células epiteliales que descansa sobre una membrana basal y rodea una gran luz que sirve como recipiente de la saliva.

Figura 3. Aparato salivar de un flebotomo. En color verde quedan remarcadas la glándula salivar, conducto salival común y la bomba salivar. Fuente: Jobling (1978) y Modificada por Martín-Martín I.



Una glándula salivar totalmente distendida puede medir $180\ \mu\text{m} \times 140\ \mu\text{m}$ para especímenes del género *Phlebotomus*, siendo las glándulas de *Lutzomyia* de menor tamaño (Adler y Theodor, 1926; Nieves *et al.*, 2011). Como se ha descrito, existe una heterogeneidad morfológica típica para los miembros del subgénero *Phlebotomus*, ya que todos los demás flebotomos (miembros de *Phlebotomus*, subgénero *Larrousius*, *Adlerius*, *Paraphlebotomus* y *Euphlebotomus* y género *Lutzomyia*) poseen un par morfológicamente homogéneo. Por ejemplo, en el caso de *P. papatasi* (Fig. 4), una de las glándulas la podemos encontrar completamente inflada pudiendo alcanzar alrededor de $190 \times 160\ \mu\text{m}$ en el caso, mientras que la otra es más pequeña y se encuentra en aproximadamente $165 \times 140\ \mu\text{m}$ (Abdel-Badei *et al.*, 2012) y el mismo fenómeno se ha descrito para *P. duboscqi* (Lestina *et al.*, 2017).

Figura 4. Detalle de las glándulas salivares de *P. papatasi*. Escala en mm. Fuente: Jobling (1978).



El abdomen 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 con marcado dimorfismo sexual en el desarrollo de sus apéndices. 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 *et al.*, 1971).

En las hembras (Fig. 5), desde el 8º y al 10º segmento se encuentran invaginados dentro del séptimo tergito (tg) y esternito (stn), encontrándose extendidos únicamente durante la ovoposición, apareamiento y defecación (Davis, 1967). La genitalia está formada por un par de espermatecas que están en contacto, en el noveno segmento, con la abertura ventral de la vagina, el atrio genital, rodeado de una pared quitinosa abierta hacia detrás, y la furca. La morfología de las espermatecas, constituida por un conducto, un cuerpo y la cabeza, es ampliamente utilizada en sistemática.

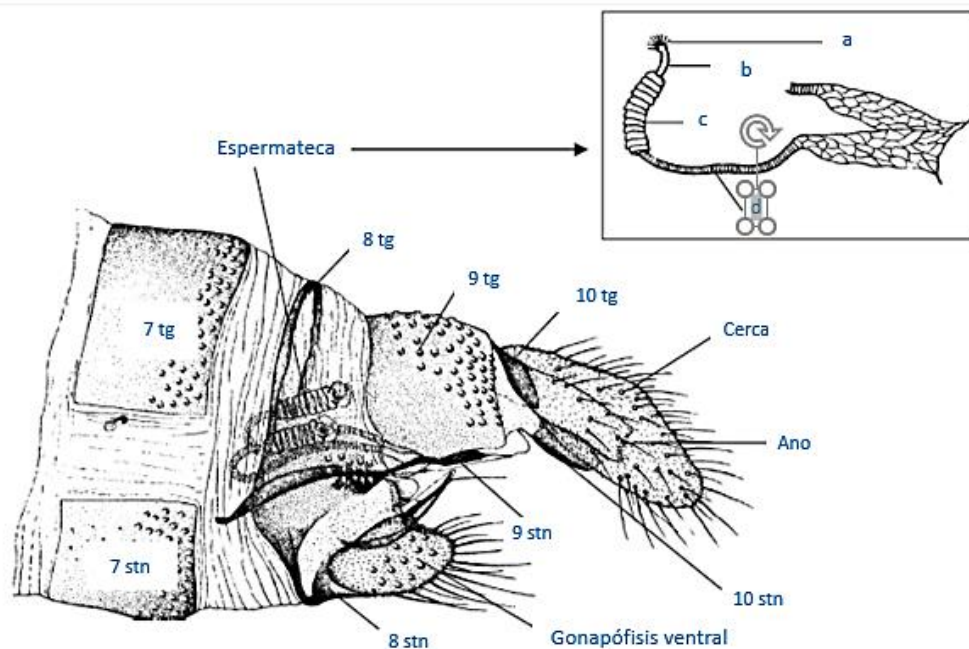


Figura 5. Abdomen terminal de hembra de *P. papatasi* desde el tergito (tg) y esternito (stn) nº7 hasta la zona más caudal y espermateca con: a) cabeza b) cuello c) cuerpo y d) conductos espermáticos. Fuente: Theodor (1958) y Jobling (1978), modificado por Risueño Irazo J.

En los machos (Fig. 6), los segmentos 7º y 8º están reducidos y los segmentos 9º y 10º están muy modificados y desarrollados, conformando el aparato copulador o genitalia. Se distinguen un par de apéndices voluminosos y articulados, formados por un segmento basal (coxito) donde se articula un segmento apical o estilo, un par de apéndices que nacen a nivel de los coxitos (parámetros), un par de prolongaciones basales (surestilos o lóbulos basales) y un par de láminas membranosas, soldadas en la cara interna de los surestilos, los cercos. El aparato genital interno comporta la presencia de dos testículos, dos canales deferentes, una vesícula seminal y un canal eyaculador que desemboca en un órgano fuertemente quitinizado, la pompa genital, de donde parten los filamentos genitales que van a parar a la correspondiente valva peniana o aedeago (Lane, 1993; Srinivasan y Jambulingam, 2012).

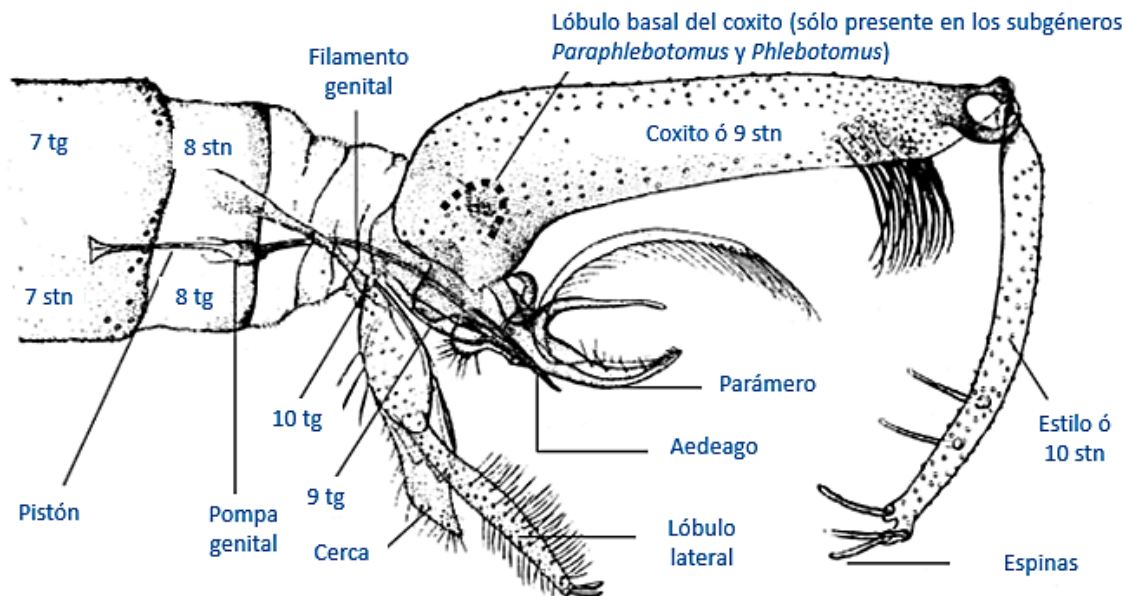


Figura 6. Abdomen terminal de macho de *P. papatasi* desde el tergito (tg) y esternito (stn) n°7 hasta la zona más caudal donde se observa la genitalia externa completa. Fuente: Jobling (1978), modificado por Ríos y Iranzo J.

Además del adulto o imago, en el **desarrollo de su ciclo evolutivo**, el flebotomo pasa por el huevo, los estadios larvales y la pupa cuyas características son distintivas. Los

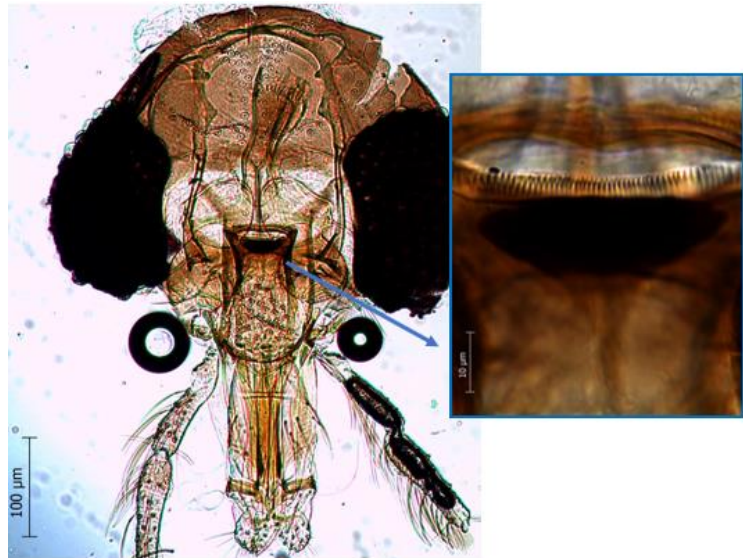
huevos presentan forma elíptica, coloración marronácea, miden alrededor de 0.4 mm de longitud y mediante microscopía electrónica de barrido presentan unas características morfológicas coriónicas con utilidad taxonómica (Rogo *et al.*, 1992; de Almeida *et al.*, 2004). Por lo que respecta a las larvas, son orugas eucéfalas con capsula cefálica y pequeñas antenas en forma de hoja. Presentan largas cerdas caudales (un par en el primer estadio y dos en los siguientes) que pueden ser útiles en su identificación como larvas de flebotomo, aun así, no suelen emplearse en taxonomía ya que las larvas son muy difíciles de encontrar en la naturaleza (Felicangeli, 2004). La pupa mide 2mm aproximadamente y presenta un color que varía progresivamente de blanco a pardo oscuro.

1.2.3. Características morfológicas para la identificación de los flebotomos

El estudio sobre las características morfológicas de la entomofauna ha puesto en manifiesto una serie de caracteres que presentan una amplia variabilidad entre las especies y, por lo tanto, son de gran valor taxonómico. Entre las estructuras principales y más empleadas que nos llevan a diferenciar las especies encontramos: la genitalia (espermoteca en el caso de las hembras), la faringe y el cibario, éstas últimas situadas en la cabeza. El cibario es una continuación de la faringe de gran importancia taxonómica, sobre todo en las hembras. Está formado por dos series de dientes, anteriores y posteriores. El número, tamaño y disposición de los dientes del cibario es muy útil a la hora de distinguir géneros, especies y grupos de especies distintivas (Ashford, 1991). Concretamente a la hora de distinguir hembras del género *Phlebotomus* y *Sergentomyia* presentando el cibario desarmado y armado, respectivamente. Esta característica se puede observar bajo el estereomicroscopio observando una marcada mancha pigmentaria entre los ojos en las hembras de *Sergentomyia*. Una vez clasificadas, el cibario también nos ayuda a distinguir a las dos especies de *Sergentomyia* presentes en España, *S. minuta* y *S. fallax*. En el primer caso el Cibarium presenta 20-85 dientes formando una empalizada

compacta y ligeramente incurvados hacia atrás (Fig. 7). En el caso de *S. fallax* presenta 20 dientes agudos formando un arco cóncavo hacia atrás (Theodor, 1948).

Figura 7. Cabeza y cibario armado de la especie *Sergentomyia minuta* de el estudio entomológico realizado en la CARM y realizada por Risueño Iranzo, J.



La faringe consta de tres placas que encierran una cavidad de forma triangular en sección transversal. La base de la faringe puede tener espículas, escalas, dientes, líneas dentadas o puede ser desarmada, al conjunto de todo ello se le denomina armadura faríngea. La forma de la faringe, que por lo general presenta conformación en botella, varía considerablemente entre especies en cuanto a tamaño, forma y distribución de los dientes en la armadura faríngea (Theodor, 1948). Para distinguir las dos especies de *Sergentomyia* descritas en España, la faringe de *S. fallax* presenta una forma chata acorazonada muy distintiva mientras que en *S. minuta* es elongada (Benabdennbi *et al.*, 1996). Dentro del Género *Phlebotomus* se observan grandes diferencias en la armadura faríngea de las hembras que se emplean para la distinción de subgéneros. En el caso del Subgénero Larrousius los dientes de la faringe aparecen en la base como un punteado refringente de pequeño tamaño, la armadura faríngea del Subgénero Paraphlebotomus aparece más desarrollada, con unos dientes en forma de placas superpuestas dando un aspecto mucho más oscuro y en el subgénero *Phlebotomus* la armadura faríngea aparece con una red de líneas en medio que la cubren longitudinalmente (Dantas-Torres *et al.*, 2014).

Los maxilares son la parte de la probóscide de mayor importancia taxonómica (Léger y Depaquit, 1999). De acuerdo a la forma del maxilar los flebotomos se dividen en "ridge-tip" y "hook-tip" dependiendo de las preferencias alimentarias de cada uno. Mientras que los flebotomos "ridge-tip" prefieren alimentarse de reptiles, los flebotomos "hook-tip" (el género *Phlebotomus*) tienen como preferencia alimentaria a los mamíferos (El-Hossary, 2006).

Las longitudes relativas de los segmentos de las antenas se utilizan para distinguir especies estrechamente relacionadas (Lane,1993). La mayoría de los segmentos de las antenas peludas poseen receptores sensoriales, denominados ascoides, y son de gran interés taxonómico especialmente en el género *Lutzomyia* ya que varían en la forma y en tamaño en relación con el segmento (Lewis,1975; Lewis *et al.*, 1977).

Entre los diferentes segmentos del **tórax**, el mesotórax adquiere mayor importancia taxonómica al por ser donde se localizan las alas del díptero. Aunque por lo general la venación alar es constante en los flebotomos, la longitud de las venas, los lugares en los que desembocan en la periferia y los puntos en los que se ramifican representan caracteres específicos que pueden ser útiles a la hora de distinguir géneros y diferenciar especies (Fig. 8). Los parámetros taxonómicos empleados en su caso son las posiciones relativas de diversos puntos de confluencia en las nerviaciones (Rioux y Golvan, 1969; Dvorak *et al.*, 2006). De esta manera, en las especies del género *Phlebotomus* $\alpha > \beta$, mientras que en las pertenecientes al género *Sergentomyia* $\alpha < \beta$.

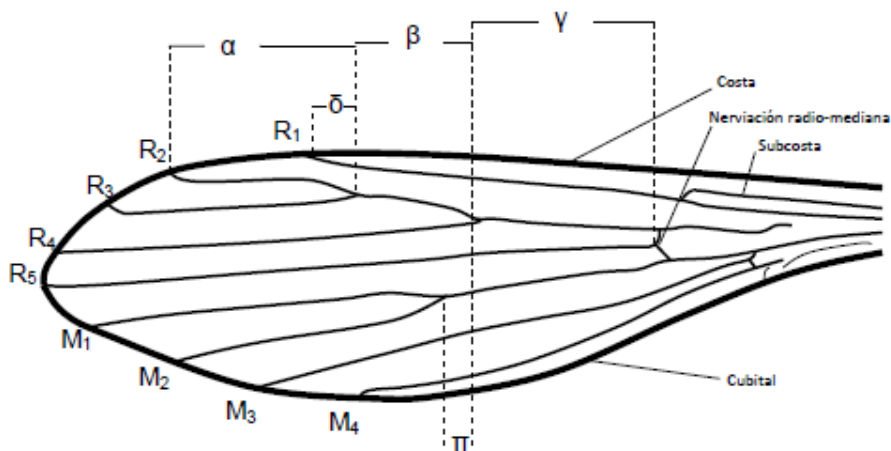


Figura 8. Morfología alar del flebotomo. Fuente: cuaderno del Dr. Shabaan El-Hossary (2006) y modificado por Risueño Iranzo J.

Estas nerviaciones reciben la siguiente nomenclatura:

- 1) Longitudinal simple: R1.
- 2) Longitudinal o sector radial: Se divide en R2, R3 y R4.
- 3) Longitudinal simple: R5.
- 4) Longitudinal: M1 y M2.
- 5) Longitudinal simple: M3.
- 6) Longitudinal simple: M4.
- 7) Longitudinal simple o cubital.

El **abdomen** del flebótomo es más o menos cilíndrico y está compuesto por 10 segmentos. En los segmentos terminales del abdomen encontramos la genitalia, fácil de diferenciar entre ambos sexos. Por los machos las estructuras diana empleadas su diferenciación son en mayor medida las espinas de los estilos cuyo número, longitud y disposición nos ayudan a distinguir entre género (Género *Sergentomyia* 4 espinas) y especie y las valvas peneanas o aedeagus cuya morfología es distintiva de especie (Martínez-Ortega y Conesa-Gállego, 1987). Por otro lado, encontramos los parámetros, ampliamente desarrollados en la especie *P. papatasi* y los lóbulos basales del coxito empleados para distinguir entre las especies del subgénero *Pharaplebotomus* (Gállego-Berenguer, 1992). En las hembras, la presencia o no de anillos en las espermatecas nos

ayudan a diferenciar entre géneros. De esta manera el género *Sergentomyia* presenta una espermateca tubular no anillada mientras que dentro del género *Phlebotomus* las espermatecas presentan un mayor o menos número de anillos que, junto con la base del conducto espermático, el cuello de la espermateca y la cabeza nos ayudan a diferenciar a las distintas especies (Martínez-Ortega y Conesa-Gállego, 1987).

1.2.4. El ciclo de vida, biología y etología de los flebotomos

Los flebotomos son insectos holometábolos, de manera que presentan un desarrollo con metamorfosis completa en el que se describe una fase de huevo, cuatro estadios larvarios terrestres, una pupa sésil y una fase adulta o imago (fig. 9). El letargo puede suceder durante el último estadio larvario o la fase de huevo, dependiendo de la zona climatológica (Ready, 2013).

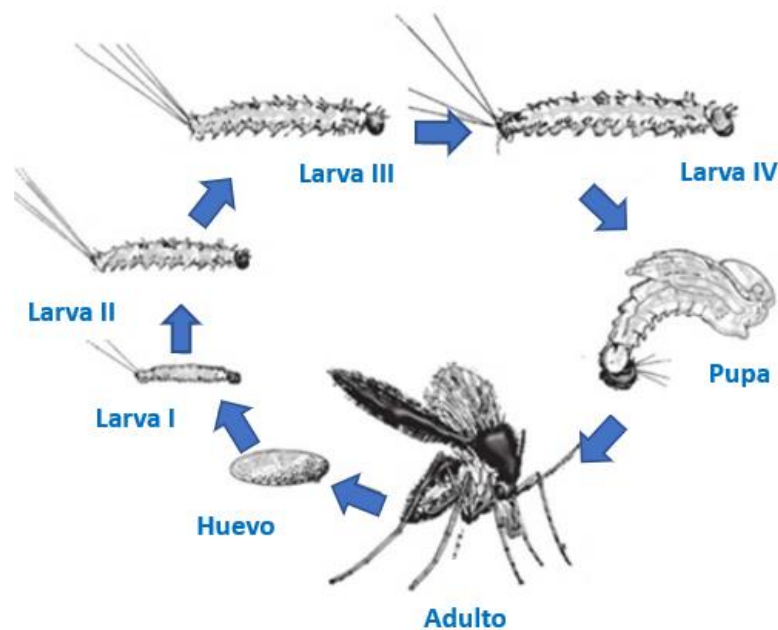


Figura 9. Fases del ciclo biológico del flebotomo. Fuente: WHO (2010) y modificado por Risueño Irazo, J.

Los machos llevan a cabo un peculiar ritual de cortejo para atraer a las hembras, baten rápidamente las alas en las proximidades de la hembra y realizan movimientos característicos del abdomen. En este proceso de cortejo, intervienen las feromonas sexuales liberadas a través de la cutícula de los terguitos (Ward *et al.*, 1993), cada una de

las placas que cubren el dorso del artrópodo. Tras el apareamiento y alimentación con sangre, las hembras grávidas buscan un lugar adecuado donde realizar la puesta. El comportamiento del flebotomo en esta búsqueda está regido por una compleja interacción de factores fisiológicos y ambientales, entre los que destacan la temperatura, humedad y fotoperiodo. Este comportamiento conlleva la agregación de huevos en los lugares de puesta, fenómeno ya descrito en otros dípteros hematófagos, cuyo objetivo sería maximizar la supervivencia de la progenie (McCall y Cameron, 1995). Los lugares de oviposición preferidos suelen ser madrigueras, grietas y oquedades, terrenos húmedos con alto contenido orgánico que reúnen las condiciones necesarias de alimento y refugio de las larvas (Munstermann, 2005; Sharma y Singh, 2008).

Los **huevos** (Fig. 10, A) suelen eclosionar entre los 7-20 días posteriores a la puesta y, dependiendo de la especie y la temperatura ambiental (Claborn, 2010), cada puesta se compone de 40-70 huevos de media en base a la especie, cantidad y calidad de la fuente alimenticia. Tras la eclosión, el desarrollo larvario pasa por los 4 estadios y 3 mudas, periodo relativamente lento que oscila entre 4 a 8 semanas. Los **estadios inmaduros** (Fig. 10, B, C, D, E) y debido a su carácter terrestre, poseen una cutícula gruesa y espinosa que las protege de la desecación. Tras este periodo se da la fase de la pupación. La exuvia o exoesqueleto que elimina la lava IV al realizar la muda sirve de fijación de la pupa al sustrato (Feliciangeli, 2004). La **pupa** (Fig. 10, F) permanece inmóvil, aunque reacciona en respuesta a estímulos, mediante movimientos bruscos del segmento anterior (Munstermann, 2005). Además, se han descrito sustancias repelentes liberadas por las pupas que podrían intervenir en mecanismos de defensa frente a la depredación o canibalismo (Dougherty y Hamilton, 1996).

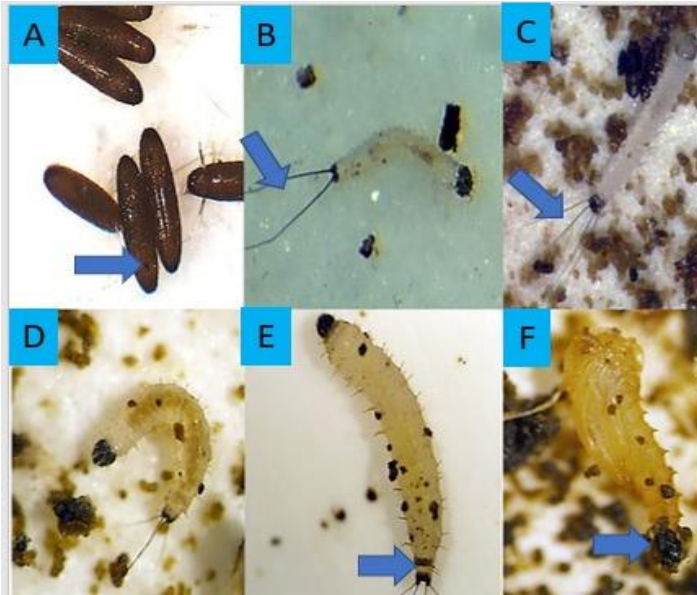


Figura 10. Diferentes estadios dentro del ciclo de *Lutzomyia diabolica*. A) Huevos, Señalando el punto de ruptura B) Larva I, la flecha apunta a las dos setas caudales C) Larva II, la flecha apunta a las cuatro setas caudales D) Larva III E) Larva IV, la flecha apunta a la placa anal dorsal F) Pupa del flebotomo, quedando señalado al 4° exuvio en la parte mas caudal del pupario. Fuente: Lawyer *et al.* (2017) y modificado por Risueño Iranzo J.

Los **adultos** emergen pasados unos 10-60 días después del estadio de pupa, con un predominio en la eclosión de machos en el principio. En el caso de los machos, la genitalia se encuentra con los apéndices rotados nada más eclosionar, haciendo imposible la cópula. Deben de pasar entre 12-33 horas tras la emergencia del macho, según la especie, para que ocurra una rotación de la genitalia 180° y permitir así el apareamiento (Votýpka *et al.*, 2015). En condiciones artificiales de laboratorio, el 51% de los machos de *P. perniciosus* tenían sus genitales girados a las 24 tras la eclosión y a las 48 h esta cifra aumentaba al 93.4% mientras que en la especie *P. papatasi* esta rotación se produce a las 7 horas de la emergencia (Ferrovalho *et al.*, 2015). Esta información puede resultar útil ya que, aunque encontrar los puestos de cría de los flebotomos es una tarea bastante complicada, los hallazgos de machos juveniles con genitales externos sin rotación nos podrían dar una pista sobre sitios naturales de reproducción.

En flebotomos mantenidos en el laboratorio el ciclo completo dura alrededor de 6 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales y la especie de flebotomo. Sin embargo, es escasa la información que se tiene al respecto sobre especímenes capturados en el campo. En condiciones artificiales se ha demostrado que la esperanza media de vida en hembras adultas de *P. papatasi* se encuentra entre 10-17 días dependiendo de su

alimentación (Abdel-Hamid, 2012). Otros trabajos han estudiado cómo afecta negativamente la infección por *L. infantum* a la longevidad de *L. longipalpis* y *L. pseudolongipalpis* (Agrela y Feliciangeli, 2015). Los datos arrojados sobre la esperanza de vida de los flebotomos en cautividad no reflejan la realidad de la naturaleza, ya que en cautividad raramente las hembras sobreviven a la primera oviposición. En estudios de marcaje, liberación y recaptura llevados a cabo con *P. ariasi* en Francia, se recuperaron algunos flebotomos hasta 29 días después de su liberación (Killick-Kendrick *et al.*, 1984).

Como ya se ha mencionado antes, las hembras, además, requieren de la ingesta de sangre y procesamiento de sus proteínas para el desarrollo de los huevos (killick-kendrick, 1999), siendo así las únicas que pican y las responsables de la transmisión de leishmaniosis. Se conocen algunos casos de autogenia, fenómeno por el cual algunas especies son capaces de realizar la puesta de huevos fértiles en ausencia de alimentación sanguínea previa, como en el caso de hembras de *P. papatasi* y *Lutzomyia lichyi* entre otras, con lo que consiguen el mantenimiento de la población en periodos de ausencia del reservorio (el-Kammah, 1973; Montoya-Lerma, 1992; Srinivasan y Panicker, 1993; Chelbi y Zhioua, 2007). Sin embargo, pueden ingerir sangre tanto de hospedadores de leishmania como de otras especies incluidas las aves, reptiles y anfibios, según la especie de flebotomo. El conocimiento de las preferencias de la hembra a la hora de nutrirse de un tipo de sangre u otra en condiciones naturales es muy útil para comprender su capacidad vectorial (Rossi *et al.*, 2008). Los nutrientes adquiridos tras la toma de sangre afectan la fecundidad y longevidad de las hembras (Jarvis y Rutledge, 1992) y su digestión dura entre 3 y 10 días permitiendo la maduración de entre 50 y 200 huevos.

Los adultos, tanto los machos como las hembras se alimentan de líquidos. Ambos, ingieren sustancias azucaradas que les proporcionan la energía necesaria para su supervivencia incluidas la savia y néctar de plantas o azúcares que producen otros insectos como los áfidos y cóccidos. Por su forma de alimentarse, los flebotomos son telmófagos, dado que al cortar la piel seccionan capilares y producen charcos de sangre alimentándose de ellos al aspirar directamente, a su vez cortan terminaciones nerviosas generando dolor.

Entre las especies domésticas encontramos exofílicas o endofílicas, en función de si pican en el exterior o interior de las viviendas, aunque este comportamiento es variable en una especie dentro de distintas áreas geográficas (killick-kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008).

Las distintas especies difieren en cuanto al número de ingestiones de sangre que realizan dentro de un ciclo gonotrófico. Frecuentes ingestiones de sangre aumentan el contacto entre vectores y vertebrados y, a su vez, la eficiencia de la transmisión de Leishmania. A lo largo de su vida, una hembra puede picar entre tres y cinco veces, aunque la gran mayoría muere al realizar la primera. Una vez ingerida la sangre, las hembras reposan durante 6 a 9 días lo que permite que se digiera la sangre y terminen de desarrollar los huevos. El tiempo que transcurre desde una ingesta de sangre hasta la maduración de los huevos depende de la especie, la velocidad de digestión y la temperatura ambiente. (killick-kendrick,1999).

A diferencia de los mosquitos, el ataque de los flebotomos es silencioso por estar el cuerpo cubierto de pelo y su capacidad de vuelo es inferior al de estos (killick-kendrick ,1999). Presentan un vuelo corto y errático, desplazándose hacia el hospedador mediante saltos cortos y su rango de acción para *P. ariasi* se encuentra en 2 km (killick-kendrick *et al.*, 1984; Léger y Depaquit, 1999). Por el contrario, las especies silvestres neotropicales no llegan a dispersarse a más de 1 km (WHO,2010). La velocidad del vuelo en flebotomos es bastante lenta (<1 m/s) (killick-kendrick *et al.* ,1986) siendo incapaces de volar en momentos en los que el viento supera la velocidad de su vuelo.

1.3. Métodos de captura de flebotomos

La vigilancia de los vectores tiene como objetivo principal determinar la presencia y abundancia de individuos en una determinada población con intención de estimar el riesgo de transmisión de una enfermedad. En el caso de flebotomos existen métodos de captura distintos para ejemplares adultos y fases inmaduras. Sin embargo, debido al escaso conocimiento de los lugares precisos de cría de los flebotomos, la vigilancia se enfoca en la captura de adultos, ya se encuentren en reposo o activos. Por su amplia distribución geográfica y adaptación a condiciones ambientales muy dispares, los métodos de captura de los flebotomos son variados y esto es un factor muy importante para la optimización de los estudios de campo (Ayhan *et al.*, 2017). Dependiendo del objetivo de la investigación existe también una amplia gama de trampas y técnicas disponibles para capturar flebotomos como se describe a continuación (Alexander, 2000).

1.3.1. Muestreo de ejemplares adultos

1.3.1.1. Captura por intercepción

Incluye los métodos carentes de estímulos de atracción y se capturan ejemplares que se encuentran con la trampa a su paso por el lugar donde ésta se localiza. Generalmente las trampas por intercepción se colocan en posibles vías de migración de insectos o zonas de reposo (Alexander, 2000; Alten *et al.*, 2015).

Entre los métodos de trampeo por intercepción se encuentran el uso de **trampas adhesivas** o "sticky traps" y las más comunes consisten en una lámina de papel impregnado con aceite de ricino colgada o intercalada en lugares en los que se desea conocer la existencia o ausencia de flebotomos.

Las propiedades del aceite de ricino lo convierten en un medio ideal para esta finalidad, dado que posee una excelente viscosidad, confiere una buena conservación de

los ejemplares, es soluble en alcohol 95° (lo que permite recuperar los ejemplares de manera sencilla para su posterior identificación) y, además, reduce el poder atractivo de posibles depredadores (hormigas, roedores, gasterópodos, etc.). Las trampas adhesivas son económicas y fáciles de preparar en grandes cantidades y de conservar hasta ser requeridas (Alexander, 2000). Una desventaja de este tipo de trampas es que son inefectivas en lugares en los que hay una humedad relativa alta debido a la viscosidad del aceite de ricino y, aunque existen otras sustancias de viscosidad más apropiada para climas húmedos, tienden a atrapar también grandes insectos contribuyendo a una peor identificación de los de menor tamaño como los flebotomos.

Además de las trampas adhesivas otro tipo de trampa de intercepción muy popular en zonas tropicales son las **trampas “Malaise”** (Malaise 1937, Lamarre *et al.*, 2012). Están diseñadas para atrapar insectos voladores, particularmente del orden Diptera e Hymenoptera. Este tipo de trampa funciona para insectos que presentan geotropismo negativo, es decir, al ser interceptados durante el vuelo tienden a dirigirse hacia la zona superior de la trampa. Está recomendado su uso junto a otras trampas para complementar la información de la fauna flebotomina de ciertas áreas y para capturar flebotomos con actividad diurna (Andrade-Filho *et al.*, 2008). Consisten en un conjunto de mallas de nylon colgadas entre los árboles de probables rutas de vuelo de los insectos. Los insectos se introducen en la trampa por la parte inferior y en su intento de huida hacia la apertura superior de la trampa caen atrapados en un recipiente con sustancias químicas nocivas para el flebotomos como el acetato de etilo, el tetracloruro de carbono o el cianato potásico (Matthews y Matthews, 2017). Generalmente se realizan modificaciones en la entrada mediante la reducción de la misma o la colocación de una maya de alambre para evitar la entrada de insectos voladores más grandes capaces de dañar o comerse a los flebotomos (Hutcheson, 1991).

A diferencia de las trampas de atracción que se describen a continuación, las de intercepción capturan una muestra aleatoria de los flebotomos de una zona concreta. Dado que la distribución de los insectos no es uniforme, para obtener una estimación cuantitativa precisa de los flebotomos en una zona es necesario emplear un número elevado de ellas (Alexander, 2000).

1.3.1.2. Método de trapeo por atracción

Los flebotomos son fototrópicos en mayor o menor medida según las especies y, en el caso de las hembras, según su estado. Entre las especies de mayor fototropismo se encuentran todas las que tienen capacidad vectorial (Martínez-Ortega *et al.*, 1991; Lahouiti *et al.*, 2014). Por ello las trampas que incorporan una fuente de luz son las más utilizadas para la captura de vectores flebotominos y son muy útiles para estudios epidemiológico, aunque menos útiles que las de intercepción para estudios de diversidad de especies. Las **trampas de luz** se cuelgan de ramas o apliques en superficies y además de una bombilla incorporan un ventilador que succiona los insectos cuando se aproximan a la luz. Funcionan con una batería y algunas poseen una fotocélula que activa las trampas durante las horas de oscuridad que es cuando los flebotomos adultos están activos. El rango de atracción de las trampas de luz oscila entre 2-6 m según los estudios (Killick-Kendrick *et al.*, 1985; Valenta *et al.*, 1995; Campbell-Lendrum *et al.*, 1999) y la captura de flebotomos y otros insectos hematófagos puede verse incrementada mediante el uso de dióxido de carbono (CO₂) (Signorini *et al.*, 2013).

La atracción de otros insectos puede suponer un problema de las trampas de luz ya que al permanecer vivos tras la captura pueden depredar y dañar con sus movimientos a los flebotomos en la trampa. Por ejemplo, las hormigas constituyen un grave problema ya que son capaces de devorar todos los especímenes capturados en un corto periodo de tiempo antes de tomar alguna precaución, tal como poner repelente o una sustancia pegajosa sobre la cuerda que sostiene la trampa (Alexander, 2000).

La distancia de colocación de la trampa con respecto al suelo o a otra superficie sólida puede afectar de forma importante a la abundancia de capturas (Faiman *et al.*, 2009a; Faiman *et al.*, 2011; Gaglio *et al.*, 2014). Por su limitada capacidad de vuelo las capturas de la mayoría de especies del VM son mayores en trampas próximas a superficies. Sin embargo, algunas especies de ambientes tropicales del NM son relativamente más activas a mayor altura sobre el suelo, incluso a la altura del dosel arbóreo, y por lo tanto tienden a estar infrarrepresentadas en muestras tomadas a nivel del suelo (Chanotis *et al.*, 1974; Alexander, 2000). Se debe por lo tanto tener especial cuidado a la hora de interpretar los estudios de distribución vertical de flebotomos con el uso de trampas de luz, más aún teniendo en cuenta que los flebotomos pueden volar hacia arriba en respuesta a una fuente de luz inusual (Alten *et al.*, 2015).

El descubrimiento de que los machos de *L. longipalpis* producen feromonas de cortejo (Lane *et al.*, 1985) hizo pensar en el uso de métodos de captura de las hembras basados en el empleo de extractos de feromonas de los machos diseminadas por el calor. Sin embargo, en los ensayos preliminares con trampas de feromonas se obtuvieron resultados pobres (Ward *et al.*, 1990). Aunque estudios posteriores en los que combinaban tales feromonas con extractos pertenecientes a hospedadores (orina de rata y glándula uropígea de gallinas), potenció la atracción (Nigam y Ward, 1991).

De mayor éxito estaría la metodología de trampeo mediante el **uso de cebo animal y cebo humano**, basada en la atracción de los flebotomos por el CO₂ y otros mediadores bioquímicos que emanan los animales. Entre las trampas que se incluyen dentro de este apartado serían la trampa "Disney" (Disney, 1966; Dorval *et al.*, 2010) formada por una bandeja de metal impregnada de aceite de ricino sobre la que se sitúa una jaula que contiene al animal y en la que quedan adheridos los flebotomos al aproximarse. Otras trampas de este tipo son la "trampa de cono" (Montoya-Lerma y Lane, 1996) que consisten en una carpa grande hecha de material semitransparente en cuyo interior se introduce al animal, generalmente un caballo o un burro, que permite ver al animal y así como el paso de estímulos que atraen a los flebotomos como el calor corporal, el olor y el

CO₂. Los vectores entran en la trampa a través de grandes embudos que terminan en pequeñas aberturas dificultando la salida de los insectos. Al finalizar el período de muestreo, los flebotomos se recogen del interior de la carpa empleando un aspirador bucal.

Finalmente, para la captura de especies con un marcado carácter antropófilo como, *P. papatasi* y *P. perniciosus* es frecuente recurrir a la utilización de personas como "cebo humano" (Martínez-Ortega, 1985a; Martínez-Ortega, 1985b). El sujeto cebo se sitúa en la zona de interés con la espalda descubierta y a su lado otra persona captura con un aspirador bucal los flebotomos que se posan en el cebo. Este método se empleó en los primeros estudios de flebotomos realizados en la región de Murcia a finales de los años 80 (Martínez-Ortega, 1985b; Martínez-Ortega y Conesa Gallego, 1987). Debido al peligro de contraer leishmaniosis y otras infecciones, este tipo de práctica está desaconsejada o prohibida.

1.3.2. Recogida de huevos y ejemplares inmaduros

Ya que se conocen mal los lugares de cría de los flebotomos, la captura de formas inmaduras de flebotomos se lleva a cabo en sitios donde se encuentran insectos adultos en reposo. Es común la colocación de trampas de emergencia de adultos inmaduros consistentes en tuberías cortas de PVC bloqueadas en un extremo con una rejilla de malla fina o plástico transparente para permitir la inspección (Ferro *et al.* 1997). Las capturas con este tipo de trampas deben recogerse cada 1-3 días para maximizar el éxito (Casanova, 2001). Se recogen muestras de tierra y se usa una variante de la técnica de flotación de Sheather que empleando una solución densa de agua con azúcar permite separar los huevos y larvas de gran parte del resto de materiales orgánicos e inorgánicos presentes en las muestras (McCombie-Young *et al.*, 1926; Hanson, 1961; Rutledge y Mosser, 1972). Este método tiene la ventaja de preservar las larvas vivas permitiendo su desarrollo hasta el estadio adulto que son más fáciles de identificar.

1.4. La Leishmaniosis por *L. infantum* en la Cuenca mediterránea

1.4.1. El ciclo de infección de *Leishmania infantum*

En el ciclo biológico de *Leishmania* spp. se alternan una forma intracelular e inmóvil de 2 y 4 μm de diámetro denominada amastigote y presente en el hospedador vertebrado, con una forma extracelular y móvil que recibe el nombre de promastigote, presente en el tubo digestivo del vector y que presenta una morfología alargada con un cuerpo de 10 μm y un flagelo de 15 μm de longitud, que le proporciona movilidad.

El **ciclo de infección** (Fig. 11) de *L. infantum* tiene comienzo cuando un flebotomo infectado inocula los promastigotes contenidos en el intestino anterior y saliva a un mamífero durante la ingesta de sangre (Schlein, 1993). Una vez dentro del hospedador, el promastigote puede penetrar en las células del sistema fagocitario mononuclear, directamente o englobado en neutrófilos polimorfonucleares (Laskay *et al.*, 2003). Aunque se considera la manera habitual, estudios recientes confirman la probabilidad de que el parásito quede retenido alrededor de la zona de picadura, donde permanecen meses accesible a las poblaciones de flebotomo (Aslan *et al.*, 2016). Una vez en el torrente sanguíneo, el parásito accede a la célula fagocitaria donde se transforma en amastigote y se multiplica. Cuando el macrófago no puede albergar más amastigotes, se rompe y los parásitos libres invaden nuevas células monocíticas. La infección puede quedar localizada en los macrófagos de la dermis, dando lugar a la forma cutánea de la enfermedad, o diseminarse hacia la médula ósea, el hígado y el bazo, originando un cuadro visceral.

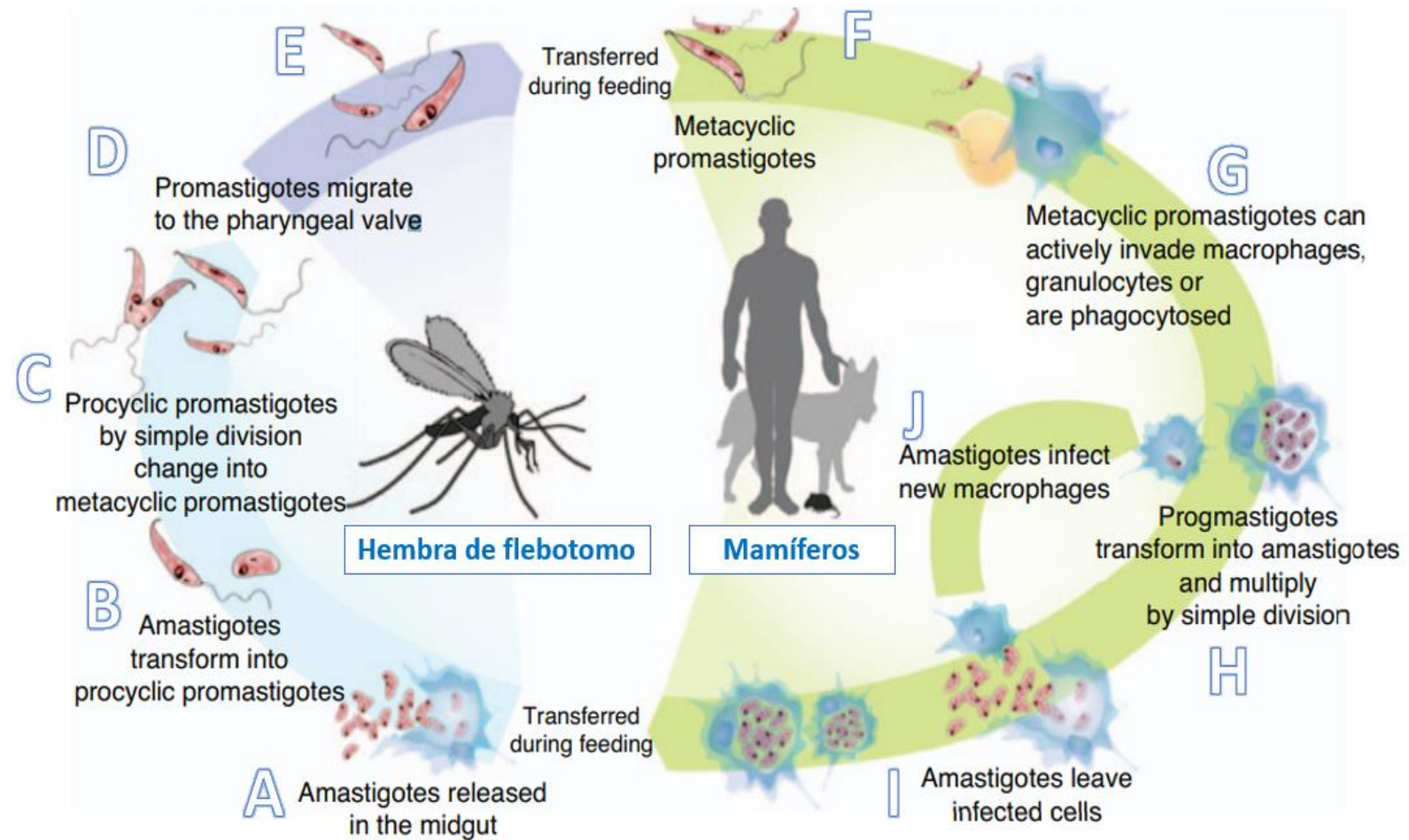


Figura 11. Ciclo de *Leishmania infantum*. En la Península Ibérica la enfermedad se transmite por *P. perniciosus* y *P. ariasi*. El flebotomo ingiere sangre del hospedador mamífero infectado y los amastigotes se liberan dentro de su intestino (A) donde se transformarán a promastigotes y se dividirán por fisión binaria (B,C). Posteriormente migrarán hacia la válvula faríngea (D) y el flebotomo infectado eliminará los promastigotes a la hora de alimentarse (E). Los promastigotes metacíclicos invadirán macrófagos, granulocitos o serán fagocitados (G) donde se transformarán en amastigotes, se dividirán e infectarán nuevos macrófagos (H,I,J).

Dentro del **invertebrado** (Fig. 12) el ciclo de *Leishmania* se realiza en el tracto digestivo donde sufrirá un proceso de transformaciones denominado metaciclo génesis inducido por cambios de temperatura y Ph entre hospedador/vector (Bates y Rogers, 2004). En el subgénero *Leishmania* los parásitos quedan restringidos al intestino medio a la hora de realizar su desarrollo (Lainson *et al.*, 1977). En cualquier caso, la sangre ingerida por el artrópodo es englobada por la membrana peritrófica, cuya síntesis comienza una hora después de la alimentación en *P. perniciosus* o a las 4 horas como sucede en *P. papatasi* y está completamente formada a las 24 horas (Secundino *et al.*, 2005). Posteriormente, en

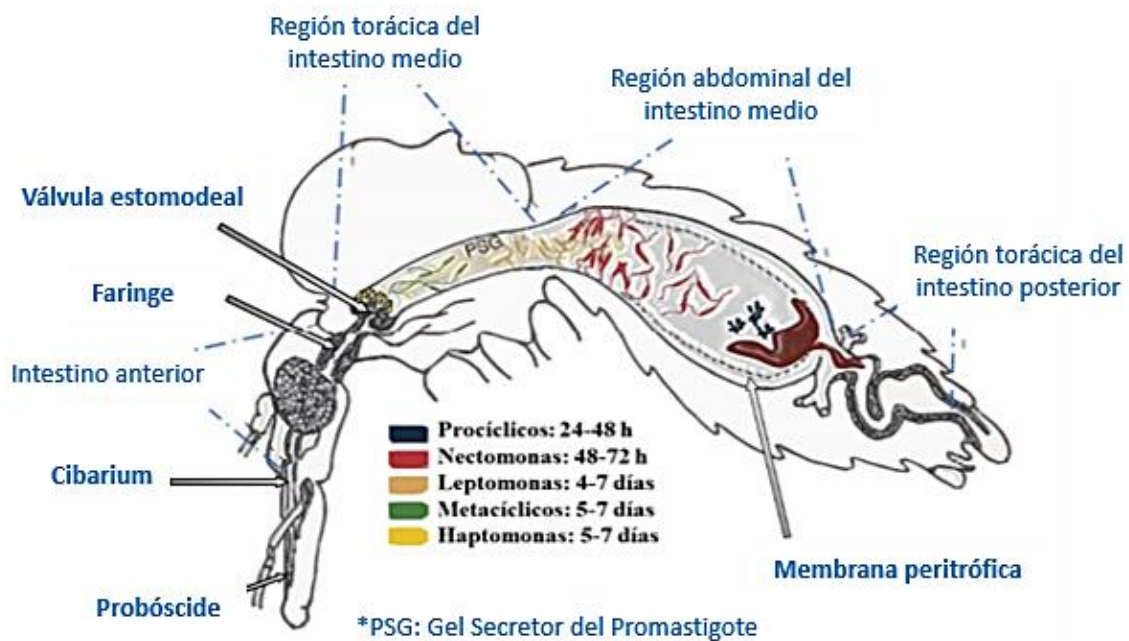


Figura 12. Ciclo biológico de *Leishmania* dentro de un vector, que ilustra la secuencia y el desarrollo morfológico de diferentes formas de promastigotes a lo largo del tracto digestivo del flebotomo. Fuente: Kamhawi (2006) y modificado por Bravo-Barriga, D. y Risueño Irazo, J.

el interior de la membrana peritrófica comienza el proceso de digestión de la sangre, en el que se lisan los macrófagos, liberándose los amastigotes, que se transforman en las primeras 12-18 h en promastigotes procíclicos, de pequeño tamaño (6-8 μm de longitud del cuerpo) y de escasa movilidad, debido a su corto flagelo (Sacks y Kamhawi, 2001; Kamhawi, 2006). Los promastigotes comienzan replicarse lentamente y se diferencian en

formas alargadas (12-20 μm), altamente móviles, denominadas nectomonas, las cuales se acumulan en la parte anterior de la membrana peritrófica, de donde escapan y se anclan a la pared del intestino medio introduciendo su flagelo entre sus microvellosidades, evitando así la expulsión con las heces (Killick-Kendrick y Rioux, 1991). Las nectomonas avanzan en su multiplicación por el intestino medio, hacia su región anterior (Bates, 2007). Un lipofosfoglicano (LPG) recubre la superficie de *Leishmania* y juega un papel esencial en la adhesión del parásito al tubo digestivo (Sacks *et al.*, 2000).

Posteriormente, la migración de parásitos hacia la región torácica del intestino medio continúa y, una vez que alcanzan la válvula estomodeal, las nectomonas cambian a leptomonas, formas más cortas (6-8 μm) capaces de entrar en un nuevo ciclo proliferativo (Gossage *et al.*, 2003). En esta fase se hace patente la aglomeración de fosfoglicanos secretados por los parásitos formando un tapón gelatinoso (PSG: *promastigote secretory gel*) que obstruye la válvula estomodeal (Rogers *et al.*, 2002). Algunas de las nectomonas/leptomonas se anclan a esta válvula y se diferencian en formas de cuerpo ancho y corto (5-8 μm) o haptomonas, que se organizan en anillos concéntricos bloqueando también la válvula (Killick-Kendrick, 1990b; Kamhawi, 2006). En infecciones avanzadas también pueden encontrarse paramastigotes anclados a la parte anterior del tubo digestivo. Estas formas poseen el núcleo adyacente al kinetoplasto (Bates y Rogers, 2004). Finalmente, algunas leptomonas evolucionan a promastigotes metacíclicos, formas no proliferativas, de cuerpo pequeño y delgado (5-8 μm), altamente móviles y con un flagelo largo (por lo menos dos veces la longitud del cuerpo) que suelen aparecer a partir del quinto día de la ingestión de la sangre infectada (Rogers *et al.*, 2002). Los promastigotes metacíclicos, las formas infectivas para el hospedador, son capaces de expresar un tipo de LPG que no permite el anclaje al epitelio intestinal asegurando su disponibilidad para su transmisión (Bates y Rogers, 2004).

Se desconoce el número de promastigotes necesarios para iniciar la infección en el hospedador. Parece depender del hospedador vertebrado y las combinaciones leishmania-flebotomo, aunque la dosis necesaria para que se establezca la infección

podrían ser mucho menores en comparación a las dosis experimentales utilizadas generalmente (Warburg y Schlein, 1986; Rogers *et al.*, 2004; Kimblin *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2011). Estudios recientes han demostrado que existe una amplia variabilidad en la dosis que puede oscilar entre 4 promastigotes y 4×10^4 en el modelo estudiado de *L. infantum* en *P. perniciosus* y *L. longipalpis* (Maia *et al.*, 2011).

Existe aún controversia sobre la forma en la que los flebotomos transmiten *Leishmania* spp. al hospedador vertebrado. La teoría más aceptada considera que la forma predominante es la regurgitación de los promastigotes presentes en el intestino, aunque también se han observado promastigotes en las glándulas salivares de los flebotomos y se piensa que podría ser transmitidos con la saliva (Killick-Kendrick *et al.*, 1996; Killick-Kendrick *et al.* 2002). La regurgitación de los promastigotes se produce al bloquear éstos el canal alimentario y dañar la válvula estomodeal poco antes de la ingestión de sangre (Bates, 2007). La disfunción que presenta la válvula en flebotomos infectados provoca una alteración en el proceso de ingestión de la sangre, lo que favorece la regurgitación de los proagastigotes (Schlein *et al.*, 1992). Se ha estudiado el daño que produce *L. infantum* en la válvula estomodeal de *P. perniciosus* y *L. longipalpis* (Volf *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2011; Alcolea *et al.*, 2016). El Gel Secretor del Promastigote (PSG) es responsable de la obstrucción física de la parte anterior del tubo digestivo, además, se produce un aumento de la presión que fuerza a la válvula estomodeal a mantenerse abierta y facilitar el reflujo (Jecna *et al.*, 2013). El PSG está compuesto por glicoproteínas donde se encuentran embebidos los promastigotes leptomonas y metacíclicos infectivos al extremo del tapón (Rogers, 2012). Los promastigotes se encuentran inmóviles, pero al liberarse el tapón se disuelve y los parásitos recuperan la movilidad (Bates y Rogers, 2004).

Una vez en el hospedador vertebrado, la transformación del protozoo a la forma amastigote vendría estimulada por el microambiente en los tejidos diana en el que el parásito se ve sometido a un estrés nitrosativo, en un medio ácido con una temperatura más elevada y a la actividad de las hidrolasas ácidas (Alcolea *et al.*, 2016).

1.4.2. La Leishmaniosis canina (LCan), una enfermedad inmunológica y clínicamente variable

La LCan es una enfermedad multisistémica con signos clínicos muy variables debido en gran parte a diferencias en la respuesta inmune desarrollada por el animal, que tiene una base genética (Baneth *et al.*, 2008). Estudios realizados con *L. major* en ratones demuestran que la respuesta al parásito se encuentra polarizada, de modo que unos individuos tienden a desarrollar una respuesta predominantemente de carácter celular y protectora, mediada por linfocitos T helper tipo 1 (Th1), mientras que en otros predomina una respuesta humoral no protectora mediada por linfocitos Th2 (Reed y Scott, 1993; Gupta *et al.*, 2013). La respuesta inmune celular Th1 en las que se produce IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 predomina en perros asintomáticos que muestran resistencia a la leishmaniosis visceral. Por otro lado, Existe la evidencia de que la producción de las citoquinas IL-4, IL-6 e IL-10 por parte de los linfocitos Th2 están asociadas a la enfermedad progresiva, concretamente el aumento temprano de IL-4 (Liew *et al.*, 1990; Pinelli *et al.*, 1999; Barbieri, 2006; Strauss-Ayali *et al.*, 2007).

La excesiva producción de anticuerpos conlleva el depósito de complejos antígeno-anticuerpo en circulación periférica y procesos de vasculitis, trombosis e infartos, responsable de las lesiones multiorgánicas típicas de la Leishmaniosis. En los perros la respuesta inmunológica a *L. infantum* no se encuentra tan sesgada en uno u otro sentido como la de los ratones a *L. major*, aunque parece claro que los animales que desarrollan cuadros viscerales graves carecen de una respuesta celular eficaz y hay una elevada producción de inmunoglobulina (Ig) G en la que participan las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Nieto *et al.*, 1999; da Costa-Val *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2009). los niveles relativos de anticuerpos IgG1 e IgG2 específicos son indicadores pronósticos de curación y enfermedad, asociando IgG1 con el desarrollo de la enfermedad e IgG2 con una infección asintomática (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 1999). El tratamiento de perros enfermos induce una mejoría clínica, acompañada de una disminución en los niveles de anticuerpos específicos (Riera *et al.*, 1999). Los niveles de IgG1 disminuyen rápido en

perros receptivos (Deplazes *et al.*, 1995), mientras que la disminución en perros que no responden es menos marcada o temporal. Por lo tanto, los bajos niveles de IgG1 (Deplazes *et al.*, 1995; Cavaliero *et al.*, 1999) son indicadores de buen pronóstico solo si se detectan después del tratamiento en animales con una expresión alta de esta inmunoglobulina antes de la quimioterapia (Solano-gallego, 2001).

Si bien los animales resistentes elaboran una potente respuesta celular que evita el desarrollo de lesiones generalizadas, no suelen eliminar completamente el parásito, que permanece en los macrófagos de forma latente en la mayoría de los animales infectados. Esta situación no es necesariamente estable y la multiplicación parasitaria puede activarse como consecuencia de situaciones que conllevan inmunosupresión y es por ejemplo típico que la incidencia de formas clínicas aumente en perros con infecciones concomitantes, tratamientos con corticoesteroides que deprimen la inmunidad celular y en animales al alcanzar la senectud (Cox, 2001; Mansueto *et al.*, 2007; Bouchekoua *et al.*, 2014).

Se ha estudiado la relación entre la susceptibilidad a la infección y determinados genotipos y razas de perros. El gen *Slc11c1* (Solute carrier family 11 member a1), anteriormente llamado N-RAMPI, y ciertos alelos del MHC II se han asociado con la susceptibilidad padecer CanL (Quinnell *et al.*, 2003; Sanchez-Robert *et al.*, 2008). Los Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler y Pastor Alemán son más susceptibles al desarrollo de la enfermedad (Sideris *et al.*, 1999; Franca-Silva *et al.*, 2003), mientras que otros como el Podenco ibicenco raramente desarrollan signos clínicos de CanL (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

Fruto de la variabilidad en la susceptibilidad a la infección, en las poblaciones de perros la distribución de los casos de enfermedad es típicamente bimodal, con un primer y mayor pico de prevalencia en perros menores de 3 años y un segundo en los mayores de 8 años (Abranches *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 2004).

Los cuadros clínicos de la LCan se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellos en los que las lesiones son de tipo cutáneo fundamentalmente y los que cursan con trastornos debidos a la visceralización del parásito. Las lesiones cutáneas son bastante comunes en la LCan (Longstaffe y Guy, 1985; Ferrer, 2002). Al comienzo de la enfermedad entre los signos clínicos más evidentes encontramos las úlceras cutáneas (Fig. 13, I), alopecias localizadas y una moderada pérdida de peso (Fig. 13, G) (Reis *et al.*, 2009). Las ulceraciones suelen estar relacionada con la acción directa del parásito (Ciaramella *et al.*, 1997), coincidiendo con el lugar de la picadura, denominado chancro de inoculación, aunque también pueden generalizarse, dando lugar a la vasculitis necrótica causada por la deposición de inmunocomplejos o a la diseminación multiorgánica del parásito (Pumarola *et al.*, 1991). A partir de la infección cutánea localizada, el parásito puede diseminarse a través de vasos linfáticos o sanguíneos, infectando macrófagos de la médula ósea, ganglio linfático, hígado y bazo, así como riñones y tracto gastrointestinal (Keenan *et al.*, 1984; Reis *et al.*, 2009) dando lugar a la visceralización de la enfermedad. Los signos clínicos iniciales son hipertrofia de los ganglios linfáticos, dermatitis exfoliativa y dermatitis periorbitaria (Fig. 13, B), nasal y en la zona de orejas y extremidades que pueden evolucionar a dermatitis ulcerativa, nodular o mucocutánea (Fig. 13, H, E, F). También puede desaparecer el brillo del pelaje, producirse un aumento exagerado en el grosor y tamaño de las uñas (onicogrifosis) (Fig. 13, D) y edema de las patas. Otros signos como fiebre, apatía, diarrea, hemorragia intestinal, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, hiperqueratosis, ulceración cutánea, (particularmente en la nariz, orejas, cola) y queratoconjuntivitis (Fig. 13, C) son frecuentes, aunque no necesariamente presentes en todos los animales (Reis *et al.*, 2009; Solano-Gállego *et al.*, 2011). Estudios llevados a cabo por Ferrer (1992), concluyeron que la afectación hepática es poco común en la LCan, mientras que la afectación renal (glomerulonefritis causada por reacciones del complejo inmune) es más común. A veces, la insuficiencia renal severa puede ser el único signo clínico, causando la muerte del animal en poco tiempo. La insuficiencia renal crónica es un resultado grave de la progresión de la enfermedad y se considera la principal causa de mortalidad por LCan. Las lesiones oculares causadas por la enfermedad afectan

principalmente a la sección anterior del ojo (McConnell *et al.*, 1970). La queratoconjuntivitis seca es una complicación de la enfermedad que se observa en casos particularmente graves. La xeroftalmia es el resultado de la acción destructiva directa de los parásitos en el aparato lagrimal y/o el resultado de la reducción de la secreción dando lugar a la hipoestesia corneal (Roze, 2002). La afectación ocular puede agravarse originándose panoftalmitis granulomatosa, causada por la presencia de parásitos en todas las estructuras oculares (Ciaramella *et al.*, 1997).



Figura 13. Signos clínicos descritos en la LCan. A) Epixtasis B) Alopecia exfoliativa periorcular y blefaritis C) Conjuntivitis purulenta y blefaritis D) Onicogriposis E) Dermatitis papular F) Alopecia exfoliativa en las patas traseras y linfadenomegalia del poplíteo G) Caquexia H) Lesiones eritematosas ulcerativas en la superficie plantar de la pata y entre almohadillas plantares I) Lesiones crateriformes nodulares que rodean el hocico. Fuente: Solano-Gallego *et al.* (2011) y modificado por Risueño Irazo, J.

En forma de porcentajes, los hallazgos principales del examen físico son lesiones dérmicas en 80%-90% de los perros, linfadenomegalia en 62%-90%, enfermedad ocular en 16%-81%, esplenomegalia en 10% -53% y onicogriposis en 20% -31% (Alvar *et al.*, 2004; Miró y Molina, 2006; de Ybáñez *et al.*, 2009). Sin embargo, los signos clínicos son variables y similares a otras patologías (Como la ehrlichiosis), por lo que hacen la lista de diagnósticos diferenciales amplios y extensos (Tafari *et al.* 2001).

Los hallazgos de laboratorio clínico incluyen anemia leve a moderada no regenerativa o más raramente regenerativa en 60%-73% de los perros; la trombocitopenia es menos común (Slappendel, 1988). Las posibles causas de la anemia son la pérdida de sangre debido a epistaxis y ulceraciones cutáneas, hemólisis, inflamación generalizada, insuficiencia renal e hipoplasia o aplasia de la médula ósea (Slappendel y Greene, 1990; Koutinas *et al.*, 1999). Entre los hallazgos bioquímicos séricos más comunes en perros con leishmaniosis canina clínica encontramos la hiperproteinemia sérica con hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, frecuentemente expresada por una disminución de la relación albúmina: globulina (Ciaramella *et al.* 1997). Las actividades de enzimas hepáticas o azotemia aumentan enormemente en solo una minoría de perros infectados. La insuficiencia renal posterior debida a glomerulonefritis del complejo inmune puede desarrollarse y se cree que es la principal causa natural de muerte. La presencia de proteinuria debe evaluarse y la enfermedad renal debe estadificarse con la medición de la proporción de proteína de la orina: creatinina. La glomerulonefritis asociada con los complejos inmunes renales es un sello distintivo de esta enfermedad. La patología renal, que incluye glomerulonefritis y nefritis intersticial, es evidente por histopatología.

Como consecuencia de la presencia o ausencia de infección y de la respuesta inmunológica variable a la misma, en zonas endémicas la población de perros incluye un porcentaje relativamente escaso (20-30%) de animales no infectados, otro mayoritario (40-50%) de perros infectados (PCR-positivos en tejido linfoide) sin signos clínicos evidentes y un tercer grupo de perros enfermos, PCR-positivos y con niveles elevados de anticuerpos (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Por lo tanto, los casos de LCan con signos clínicos representan la punta del iceberg en las zonas endémicas, donde la mayoría de la población expuesta adquiere la infección y pasa desapercibida sin evidencia clínica o respuesta serológica frente al parásito. Tanto los perros sintomáticos como los infectados asintomáticos son infectivos para los flebotomos, lo que conlleva importantes implicaciones en la transmisión, epidemiología y control de la leishmaniosis (Molina *et al.*, 1994; Courtenay *et al.*, 2002; Michalsky *et al.*, 2007; Laurenti *et al.*, 2013).

1.4.3. El perro y otros mamíferos domésticos y silvestres como reservorio de *L. infantum*

Históricamente **el perro** se ha considerado el principal reservorio de la LCan y Lhum (Moreno y Alvar, 2002; Costa, 2008) aunque su verdadero impacto como reservorio de infección no se ha conocido hasta tiempos recientes. Esto es debido al avance en el diagnóstico de la infección que ha proporcionado la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y a los experimentos de xenodiagnóstico en animales infectados sin síntomas que han demostrado que los perros infectados con o sin síntomas transmiten el parásito al vector. La probabilidad de transmisión es mayor en perros con síntomas y por ello se considera esencial tratar cuanto antes estos animales (Podaliri-Vulpiani *et al.*, 2011). El paradigma del perro como principal reservorio, y la ausencia o comparativamente escasa incidencia de leishmaniosis por *L. infantum* en otros mamíferos incluido el hombre, restringió el papel de éstos al de reservorios secundarios o accidentales con un impacto escaso en la epidemiología de la infección.

Anteriormente, **los gatos** se consideraban un hospedador accidental de *Leishmania infantum* en Europa debido un esporádico número de casos en áreas endémicas desde el comienzo del siglo (Pennisi, 2002; Pennisi *et al.*, 2013). Posteriormente a la década de 1980, a medida que aumentaba el número de gatos domésticos y su nivel de atención veterinaria, se han incrementado los informes de casos de leishmaniosis felina (LFe) por *L. infantum*, considerándose una enfermedad emergente en zonas endémicas (Pennisi y Persichetti, 2018). Si bien las infecciones subclínicas felinas son comunes en áreas endémicas de leishmaniosis canina, la enfermedad clínica por *L. infantum* en gatos es rara. La seroprevalencia oscila entre 0 y 69% y los resultados moleculares obtenidos mediante PCR se encuentran entre 0 y 61% en regiones endémicas del VM. Esta variabilidad puede deberse a diferentes niveles de endemidad, tipo de poblaciones felinas estudiadas o las diferentes metodologías empleadas (Pennisi *et al.*, 2015). Concretamente en España se llegaron a notificar un total de 21 casos y curiosamente 4 casos en gatos de Suiza importados de España (Rüfenacht *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 2014). Además, estudios

mediante xenodiagnóstico han demostrado la infectividad hacia los flebotomos, concretamente *P. perniciosus* y *L. longipalpis*, de gatos naturalmente infectados (Maroli *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2010). Aunque estos datos indican que es posible que los gatos domésticos desempeñen un papel importante en la epidemiología de la leishmaniasis, aún se desconoce su verdadero impacto (Pennisi *et al.*, 2015; Metzdorf *et al.*, 2017). Lo mismo ocurre con otras **especies del ámbito doméstico** en las que se ha detectado *L. infantum* mediante técnicas de observación directa, diagnóstico serológico y técnicas moleculares y que incluyen al caballo (Portús *et al.*, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2003; Fernández-Bellón *et al.*, 2006), hurón, jerbo, hámster, cobaya, roedores (Morillas- Márquez *et al.*, 1985; Fisa *et al.*, 1999; Muñoz-Madrid *et al.*, 2013; Navea-Pérez *et al.*, 2015), conejos (Martín-Martín *et al.*, 2014), ovejas y cabras (Fisa *et al.*, 1999) y erizos (Muñoz-Madrid *et al.*, 2013).

El papel de **las especies silvestres** como reservorio de *L. infantum* han ido adquiriendo un interés creciente y son diversas las especies en Europa en las que se ha detectado la infección por el parásito. Entre las primeras descritas se encuentra un zorro (*Vulpes vulpes*) infectado en la zona de Lyon en Francia (Roy, 1940; Houin, 1963). Años más tarde, se postuló la posibilidad de infección en la ardilla común (*Sciurus vulgaris*) en la que se describió un cuadro crónico con depilación periorbital y costras en el hocico (Ranque y Faure, 1956). En los primeros estudios llevados a cabo por Rioux *et al.* (1968) hace más de 40 años se analizaron más de 1.000 roedores, zorros y mustélidos silvestres mediante métodos de diagnóstico tradicionales, como el examen de frotis y el cultivo, encontrando solo dos zorros infectados por *Leishmania* spp. Posteriormente, Rioux *et al.* (1968) infectó experimentalmente 12 especies de roedores y carnívoros silvestres con diferentes cepas de *Leishmania* obtenidas de casos de Leishmaniosis viscerales y cutáneas en perros y personas, observándose resultados positivos en el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), en la rata noruega (*Rattus norvegicus*), lirón gris (*Glis glis*) y especialmente en el lirón careto (*Elyomys quercinus*) con tasas de infección muy elevadas.

Otros estudios realizados por Rioux *et al.* (1968) señalaron que el 26% de las hembras de flebotomos se alimentaban de conejos y más tarde obtuvieron hemocultivos

positivos de zorros infectados experimentalmente llegando a concluir que los zorros podrían ser un excelente reservorio para la leishmaniosis (Rioux *et al.*, 1971). Mientras tanto, en estudios llevados a cabo en Italia por Bettini *et al.* (1978) se aisló el parásito en la rata negra (*Rattus rattus*). Posteriormente estos investigadores inocularon macerado de bazo en hámsteres (*Mesocricetus auratus*) infectados con *L. infantum* a 160 ratas negras (*Rattus rattus*) y 35 zorros (*Vulpes vulpes*) consiguiendo infectar tres ratas y un zorro (Bettini *et al.*, 1980).

Los **modelos de laboratorio** murino (*Mus musculus*) y de hámster se han utilizado ampliamente para investigar las características clínicas e inmunológicas de las infecciones por Leishmania, y esta última especie es altamente susceptible a la visceralización de la infección por *L. infantum* (Loría-Cervera y Andrade-Narváez, 2014). Las diferentes especies de hámster: hámster rayado (*Cricetulus griseus*), hámster gigante (*Cricetulus triton*), hámster europeo (*Cricetulus frumentarius*) y hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) son sensibles a la infección independientemente de la ruta de inyección, causando cuadros clínicos graves en poco tiempo (Le-Ba-Kim, 1935; Houin, 1963). Además, en China, se han descrito hámsteres de vida libre infectados con *L. infantum* (Houin, 1963). En la península Ibérica, en la región de Setúbal (Portugal) se detectaron anticuerpos frente a *L. infantum* en 3 de 43 zorros analizados con la prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFAT). Los autores consideraron que esta tasa de seroprevalencia sería probablemente suficiente para mantener una situación endémica y que la presencia de un ciclo silvestre semi-autónomo en la zona sería probable (Abranches *et al.*, 1983). Poco después Morillas-Márquez *et al.* (1985) en Granada, lograron aislar y caracterizar ADN de *L. infantum* en *R. rattus*.

Sin embargo, no ha sido hasta la última década que con el empleo de La PCR se ha detectado infección por *L. infantum* en una elevada proporción de numerosas especies silvestres y sinantrópicas de distintas regiones y ecotopos de la Cuenca Mediterránea y España, incluidos cánidos, mustélidos, vivérridos, félicos, roedores y lagomorfos (Marín-Iniesta *et al.*, 1982; Fisa *et al.*, 1999; Criado-Fornelio *et al.*, 2000; Sobrino *et al.*, 2008;

Sastre *et al.*, 2008; Millán *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2012b; Muñoz-Madrid *et al.*, 2013; Millan *et al.*, 2014; Del Río *et al.*, 2014; Oleaga *et al.*, 2015; Navea-Perez *et al.*, 2015). El estudio de Del Río *et al.* (2014) se llevó a cabo en el País Vasco, zona considerada periepidémica de Leishmaniosis en la que no se denuncian casos autóctonos. En él se detectó una prevalencia comparativamente elevada (28%) en zorros, tejones, garduñas y otras especies, lo que sugiere que la fauna silvestre podría ser un indicador útil del riesgo de infección para perros y personas en estas zonas.

Si bien son muchas las especies de vida silvestre que pueden estar infectadas por *L. infantum*, a diferencia de los perros y humanos, la enfermedad rara vez se denuncia y las cargas parasitarias a menudo son comparativamente bajas (Tomassone *et al.*, 2018). Las razones de ello no están claras y podría deberse a la selección natural de individuos capaces de elaborar una respuesta inmunológica que controla la infección. En cualquier caso, es precisamente por esto que se mantiene la controversia sobre el papel de reservorio y las implicaciones epidemiológicas de la infección en la fauna silvestre. Los expertos consensuan que es muy probable la existencia de un ciclo selvático de *L. infantum* que opera de manera independiente y/o interactúa con un ciclo doméstico mantenido por perros (Quinell y Courtenay, 2009, Del Río *et al.*, 2014, Millán *et al.*, 2014). Sin duda el ejemplo más claro del potencial de reservorio de *L. infantum* de la fauna silvestre y de fuente de parásito para las personas es el brote de Leishmaniosis aún activo en el sur de Madrid, asociado a lagomorfos y no a los perros. En el brote se demuestra además que los ciclos de transmisión de *L. infantum* son bidireccionales ya que la cepa ITS-LOMBARDI de *L. infantum* aislada de liebres se identificó por primera vez en un caso de leishmaniosis cutánea humana en 1987, y probablemente ha estado circulando en la zona durante todo este tiempo (Chicharro *et al.* 2013; Martín-Martín *et al.*, 2015).

Aparte de los lagomorfos ninguna otra especie silvestre se ha asociado a un brote de leishmaniosis por *L. infantum* en personas o en perros. Es por esto que se mantiene la duda sobre el papel de muchas especies silvestres como reservorio primario de infección, capaz de mantener la endemicidad del parásito indefinidamente en ausencia de un

hospedador humano o canino. Esto es muy difícil de comprobar ya que apenas hay lugares endémicos de *L. infantum* en los que no hay perros. Una excepción es la isla de Montecristo en Italia y en la que se detectó ADN de *L. infantum* en 11 de 71 ratas negras lo que sugiere que en esa isla las ratas podrían actuar de reservorio primario del parásito (Zanet *et al.*, 2014). Además de las posibles diferencias de susceptibilidad a la infección e infectividad de las distintas especies silvestres, cabe esperar que haya diferencias individuales dentro de una misma especie y según la cepa del parásito (Roque y Jansen, 2014). La mejor manera para demostrar la susceptibilidad del hospedador a la infección y la capacidad de transmitir el parásito al vector es realizando experimentos de xenodiagnóstico.

La técnica se basa en exponer a un animal infectado a flebotomos no infectados y comprobar si éstos adquieren la infección tras realizar la toma de sangre en el animal. Hasta el momento solamente se ha realizado xenodiagnóstico con éxito en la rata negra (Gradoni *et al.*, 1983; Pozio *et al.*, 1985), la liebre y el conejo (Molina *et al.*, 2012b; Jiménez *et al.*, 2014) y el zorro cangrejero (Tenório *et al.*, 2011). Sin embargo, el xenodiagnóstico es una técnica que pocos laboratorios pueden llevar a cabo debido a que no reúnen los requisitos necesarios para realizarlo, incluidas las colonias de vectores y las instalaciones para el manejo de animales salvajes.

Desde otra perspectiva distinta, merecen una mención especial los animales salvajes hacinados en instalaciones zoológicas. Estudios recientes revelan la detección de ADN de *L. infantum* en orangutanes (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) y en canguros wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) cautivos en zoológicos de la Comunidad de Madrid (Montoya *et al.*, 2016; Miró *et al.*, 2018). Algunas de estas especies tienen un alto valor de conservación, como los wallabies, en los que esta infección podría tener graves repercusiones en la morbilidad y / o la mortalidad o en el lince ibérico considerado como especie amenazada (Palomares *et al.*, 2011). Además, Estos animales pueden representar un riesgo para otros animales silvestres y domésticos susceptibles localizados alrededor,

así como para los cuidadores del zoológico y los visitantes. Por lo tanto, las medidas de control son muy importantes en estas instituciones (Jusi *et al.*, 2011).

A pesar de los ya numerosos estudios de Leishmaniosis en fauna silvestre en distintas zonas de la Península Ibérica, la situación en la Región de Murcia, una de las zonas endémicas de LCan y LHum de España (Pérez-Cutillas *et al.*, 2015; Goyena *et al.*, 2016) no se ha investigado desde que Martín-Iñiesta *et al.* (1982) describieran la infección por *L. infantum* en tres zorros a principios de la década de 1980 mediante cultivo del parásito. Uno de los objetivos de esta tesis es paliar este déficit y relacionarlo con la prevalencia en perros y personas con el fin de ampliar el conocimiento de la epidemiología de la leishmaniosis tal y como se explicará más adelante.

1.4.4. Estudios de caracterización de cepas de *L. infantum* en fauna silvestre y otras especies

Los estudios en epidemiología molecular ofrecen la oportunidad de caracterizar las cepas de *L. infantum* y comparar su distribución en los distintos ecosistemas y hospedadores lo cual es útil para comprender los ciclos de transmisión del parásito. Existen distintas técnicas y marcadores moleculares para estudiar la diversidad genética tanto a nivel de especie como de subespecie (Akhoundi *et al.*, 2016). La técnica estándar empleada para la tipificación de las cepas en estudios epidemiológicos durante los últimos 30 años ha sido el análisis del patrón de electroforesis de isoenzimas multilocus (MLEE), capaz de distinguir entre especies y subespecies (Rioux *et al.*, 1990). Las variantes isoenzimáticas de *L. infantum* se clasificaron según la nomenclatura de “Montpellier” siendo el MON-1 el más frecuente, presente en más de 30 países de todo el mundo y representa aproximadamente el 70% de todas las cepas identificadas (Martínez, 2015) y es responsable de la mayoría de los casos de LV en la cuenca mediterránea y predomina en perros, gatos y humanos (Martín-Sánchez *et al.*, 2004; Pratlong *et al.*, 2004). Sin embargo, la frecuencia de zimodemas varía según las zonas geográficas y las formas clínicas de Leishmaniosis. De este modo MON-1 es responsable del 44-58% de los casos de

Leishmaniosis en España y del 96,7% de los de Portugal (Jiménez *et al.*, 1995; Campino *et al.*, 2006; Kuhls *et al.*, 2008; Cortes *et al.*, 2014). Por otro lado, hasta el 73% de las coinfecciones por VIH /*L. infantum* en Europa se deben también a este zimodema (Pratlong *et al.*, 2003) y en personas inmunocompetentes, MON-1 causa el 90% de los casos de LV, pero solo el 20% de los casos de LC (Alvar *et al.*, 1997). Por el contrario, MON-1 solo se ha detectado en el 18% de las muestras obtenidas sobre los vectores (Martín-Sánchez *et al.*, 2004). Un ejemplo es el descrito en el Priorat de Cataluña llevado a cabo por Gállego *et al.* (2001), donde el zimodema MON-77 circulaba en perros, personas y en el vector.

El estudio de patrones isoenzimáticos también se ha empleado en cepas de *L. infantum* de la fauna silvestre. Destacan los trabajos de Abranches *et al.* (1984) en Portugal en el que se observó un perfil electroforético en cepas de zorros idéntico al de humanos y perros de Portugal y otras zonas del Mediterráneo. También, los aislados de *L. infantum* de *R. rattus* en Italia mostraron patrones isoenzimáticos idénticos a los de las personas de la misma zona (Ashford y Bettini, 1987). En la provincia de Granada los estudios llevados a cabo por Morillas-Márquez *et al.* (1985) permitieron caracterizar una cepa de *L. infantum* de *R. rattus* dentro del zimodema MON-1.

La MLEE está restringida a laboratorios especializados debido a su complejidad técnica, coste y tiempo ya que requiere el cultivo de los aislados (Ovalle-Bracho *et al.*, 2018). Además, su capacidad de discriminación es más limitada que la que se obtiene empleando técnicas modernas de análisis del genoma del parásito.

Entre las técnicas empleadas para genotipar cepas de *Leishmania* spp. se incluyen la amplificación por PCR de secuencias de ADN específicas combinada con el análisis de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y la secuenciación, la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), el análisis multilocus de secuencias (MLSA) o de microsatélites (MLMA) y el análisis del polimorfismo de longitud en fragmentos amplificados (AFLP) (Schonian *et al.*, 2011). La elección de una u otra técnica conlleva un compromiso entre el

poder de discriminación y complejidad para realizar la técnica e interpretar los resultados. La rapidez de las técnicas actuales de secuenciación de ADN hace de esta técnica una herramienta de elección en los estudios de genética de poblaciones de *Leishmania* spp. Existe una amplia variedad de genes y secuencias intergénicas que son útiles para diferenciar entre especies y algunas de ellas también permiten caracterizar subespecies (Akhoundi *et al.*, 2016). Sin embargo, son escasos los estudios de caracterización de cepas de *L. infantum* de la fauna silvestre. Del Río *et al.* (2014) compararon la región ITS 2 (Internal Transcribed Spacer 2) del gen ribosomal de *L. infantum* de carnívoros silvestres del País Vasco con la de aislados de personas y perros de la Región de Murcia encontrando una elevada similitud. En brote del sur de Madrid, los aislados de *L. infantum* de las liebres, conejos y personas compartieron la misma secuencia ITS2 (Chicharro *et al.*, 2013).

A diferencia de la región ITS, las secuencias de la zona variable del minicírculo del ADN del kinetoplasto (kDNA) permiten diferenciar subespecies de *L. infantum* y como además hay unas 10000 copias de la secuencia en cada parásito, las pruebas de PCR que amplifican estas secuencias son muy sensibles (Akhoundi *et al.*, 2016). Cortes *et al.* (2006) emplearon la técnica de RFLP en un producto de PCR del minicírculo del kDNA de perros, personas y vectores flebotominos procedentes de Portugal, Brazil, África Oriental y la Cuenca Mediterránea, hallando 16 genotipos nombrados en orden alfabético de la letra A a la O.

1.5. Distribución espacial y temporal de los flebotomos y la leishmaniosis en España

Como se ha señalado anteriormente los flebotomos presentes en la Cuenca Mediterránea pertenecen a los géneros *Sergentomyia* y *Phlebotomus*. En España han sido descritas un total de 13 especies de flebotomos (Fig. 14). En 1909, Czerny & Strobl, a partir de una serie de ejemplares de flebotomos capturados por Lauffer en El Escorial (Madrid), identificaron de manera errónea la especie *P. papatasi*, siendo ésta la primera cita de flebotomos para la Península Ibérica. León-Sanz *et al.* (1998) lograron recuperar y rehidratar los ejemplares y los identificaron morfológicamente como *P. perniciosus* y *P.*

ariasi. De las trece especies descritas hasta ahora, 11 son pertenecientes al género *Phlebotomus*: -*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. langeroni*, *P. sergenti*, *P. mascitti*, *P. longicuspis*, *P. fortunatarum*, *P. alexandri*, *P. chabaudi* y *P. riouxi* y únicamente las dos primeras son de gran importancia para la salud pública, ya que están implicadas en la transmisión de *L. infantum* (Gil-Collado *et al.*, 1989; Conesa-Gallego *et al.*, 1997; Aransay *et al.*, 2004; Durán-Martínez *et al.*, 2013). Recientemente se ha añadido a *P. langeroni* como posible transmisor debido al alto porcentaje de ADN del parásito encontrado en hembras (Sáez *et al.*, 2018).

Sin embargo, el hallazgo de *P. longicuspis* en el sureste de España (Martínez-Ortega y Conesa Gallego, 1987; Morillas-Márquez *et al.*, 1991; Collantes y Martínez-Ortega, 1997), no debe ser tenido en cuenta, por cuanto estudios posteriores, bioquímicos y moleculares, han mostrado que el tipo morfológico presente en nuestro país pertenece en realidad a *P. perniciosus*, por lo que *P. longicuspis* estaría ausente de España (Guernaoui *et al.*, 2005). Así, Miró y Molina (2006) y Aransay *et al.* (2004) no la incluyen en el listado de las especies halladas en España. También existen discrepancias en cuanto a la presencia de *P. riouxi*, por lo que otros autores no la toman en cuenta (Morales-Yuste, 2012).

Por otra parte, encontramos 2 especies pertenecientes al subgénero *Sergentomyia*, *S. minuta* y *S. fallax* (Morillas-Marquez *et al.*, 2017). Entre estas dos y como se ha comentado antes, *S. minuta* es vector del grupo de Sauroleishmanias en algunas partes de África, así como en Cuenca mediterránea (Novo *et al.* 2015). El Conocimiento epidemiológico sobre la Sauroleishmania en España es escaso, aunque un estudio reciente ha descrito por primera vez la transmisión de *L. tarentolae* por el vector *S. minuta* en el Suroeste español (Bravo-Barriga *et al.*, 2016). Además, en la misma especie de flebotomo se ha detectado ADN de *L. infantum* en el sureste de Portugal (Pereira *et al.*, 2017) y ADN de *L. major* en la región meridional del Algarve, Portugal (Campino *et al.*, 2013).

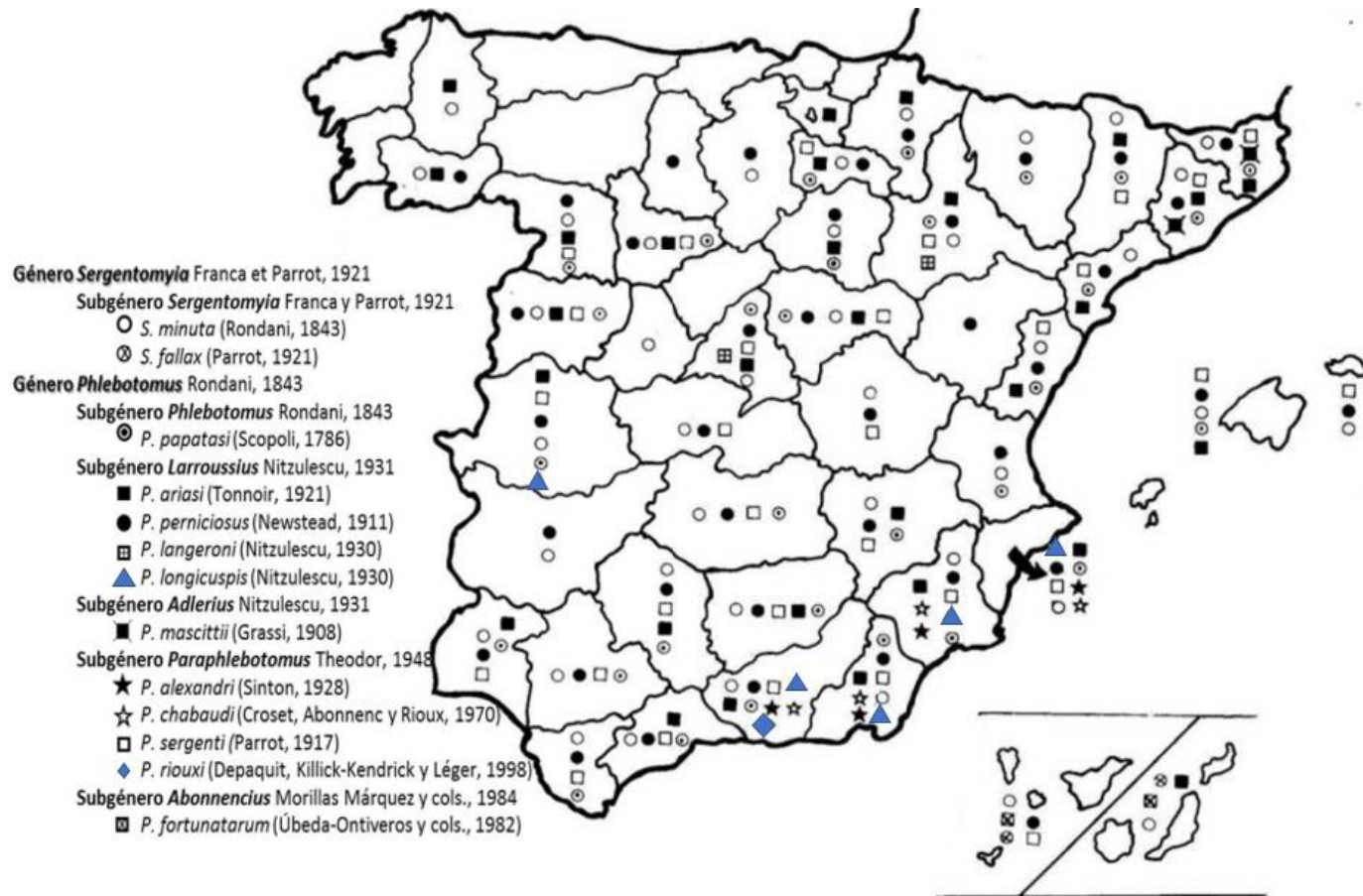


Figura 14. Distribución de las especies de flebotomos descritas en España. Fuente: Gil-Collado *et al.* (1989), Gallego-Berenguer *et al.* (1992), Morales-Yuste (2012); Barón (2011); Alcover *et al.* (2014) y Morillas *et al.* (2017). Mapa tomado de Morales-Yuste (2012) y modificado por Bravo-Barriga, D.

Los trabajos realizados por Gil-Collado *et al.* (1989) y Gállego-Berenguer (1992) ofrecieron una visión de conjunto de la distribución, morfología y biología de las principales especies presentes en España y descritas a principios del siglo XX incluidas *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *S. minuta*, señalando que se encontraban distribuidas en la mayor parte de España, aunque su abundancia es inferior en el norte del país y sobre todo en la zona cantábrica. Del mismo modo, Alonso *et al.* (2010) y Miró *et al.* (2012) revelaron que la frecuencia de casos de LCan es mayor en el sureste y más baja en el norte y oeste español (Fig. 15). Las especies *P. papatasi* y *P. sergenti* son de descripción reciente en La Rioja (Aransay *et al.*, 2004), y *P. ariasi* es la única especie identificada en Álava (Aransay *et al.*, 2004). Por otro lado, *P. mascittii* solo se ha descrito en el noreste peninsular, concretamente en Cataluña (Pesson *et al.*, 2004; Barón *et al.*, 2008; Ballart *et al.*, 2014). Las especies *P. alexandri*, *P. chabaudi*, *P. riouxi* y *P. longicuspis* son típicas de África y solamente se han hallado en el sudeste peninsular. Como se ha señalado antes, *P. longicuspis* es morfológicamente muy similar a *P. perniciosus* y su presencia en España es motivo de debate (Pesson *et al.*, 2004). *P. fortunatarum* y *S. fallax* son especies autóctonas de las Islas Canarias. En lo que concierne a Extremadura, sólo se han llevado a cabo dos estudios sobre las especies y su distribución en la provincia de Cáceres (Rosado, 1997; Blázquez *et al.*, 1999), por lo que el resto del territorio sigue sin estudiarse. En ambos trabajos mediante trampas adhesivas, se detectaron 6 especies que por orden de abundancia fueron: *S. minuta*, *P. perniciosus*, *P. longicuspis*, *P. ariasi*, *P. sergenti* y *P. papatasi*. En esta comunidad autónoma, es en la provincia de Cáceres donde se observa la mayor seroprevalencia de LCan, de 14,2%, llegando al 30% en un foco (Nieto *et al.*, 1992). La seroprevalencia en Badajoz fue 7 % (Rosado *et al.*, 1997). Finalmente, *P. langeroni*, es la última especie descrita en España concretamente en Madrid (Martínez-Ortega *et al.*, 1996; Conesa-Gallego *et al.*, 1997; Tello *et al.*, 2015), Zaragoza (Lucientes *et al.*, 1994; Lucientes *et al.*, 2001) y en la región del Ebro y Valencia (Aransay *et al.*, 2004). Los estudios de Aransay *et al.* (2004) muestran la presencia de *P. perniciosus* y *P. ariasi* en zonas de Castellón y Valencia donde se notificaron 19 casos de LHum desde 2012 al 2013,

siendo la edad adulta la más afectada (73%) y la forma clínica más frecuente fue la de tipo cutáneo (89%) (Roth-Damas *et al.*, 2016). En Andorra, donde no existen datos sobre la presencia de leishmaniosis, se ha detectado por primera vez a las dos especies vectoras en una baja abundancia (Ballart *et al.*, 2012). Finalmente, los muestreos realizados en el sureste español, han permitido identificar 7 especies de flebotomos incluidas *P. perniciosus*, *Sergentomyia minuta*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, *P. ariasi*, *P. longicuspis* y *P. chabaudi* de las cuales la más abundante fue *P. perniciosus* (Martínez-Ortega, 1985b). Independientemente, de todas estas especies presentes en España, todos los autores coinciden en que la especie más abundante y presente en gran parte del territorio nacional es *P. perniciosus*.

La distribución de los flebotomos no es estática ni homogénea y varía de acuerdo a factores ambientales y ecológicos (Ready, 2010; Alten *et al.*, 2016). Del mismo modo cabe esperar que la presencia y abundancia de *L. infantum* esté distribuida heterogéneamente e influenciada por numerosos factores ecológicos como el clima o la topografía. Con la posible excepción de las Islas Canarias (Chicharro *et al.*, 2003; Amela *et al.*, 2012; Pou-Barreto *et al.*, 2013; Morillas-Márquez *et al.*, 2017), el parásito se ha descrito por toda España incluido en el norte (Amusatogui *et al.*, 2004; Miró *et al.*, 2012), en el noreste (Lucientes-Curdi *et al.*, 1991; Fisa *et al.*, 1999; Ballart *et al.*, 2012), en el sur (Marín, 1986; Morillas *et al.*, 1996), y en la región central (Encinas Grandes *et al.*, 1988; Amela *et al.*, 1995; Miró *et al.*, 2007b; Arce *et al.*, 2013). Se ha descrito un aumento de la LCan en la comunidad de Madrid (Gálvez *et al.*, 2010). Sin embargo, resulta difícil de saber con precisión la prevalencia de LCan en las distintas zonas de España, en parte porque la mayoría de los estudios son de seroprevalencia y como ya se ha señalado los perros con anticuerpos frente a *L. infantum* solo representan una pequeña parte de los perros infectados en la población. La seroprevalencia descrita varía entre el 1,6 % de Santiago de Compostela y el 34,6 % de la provincia de Málaga y 45,3 % en Baleares. (Morillas *et al.*, 1996; Amusatogui *et al.*, 2004; Miró *et al.*, 2012).

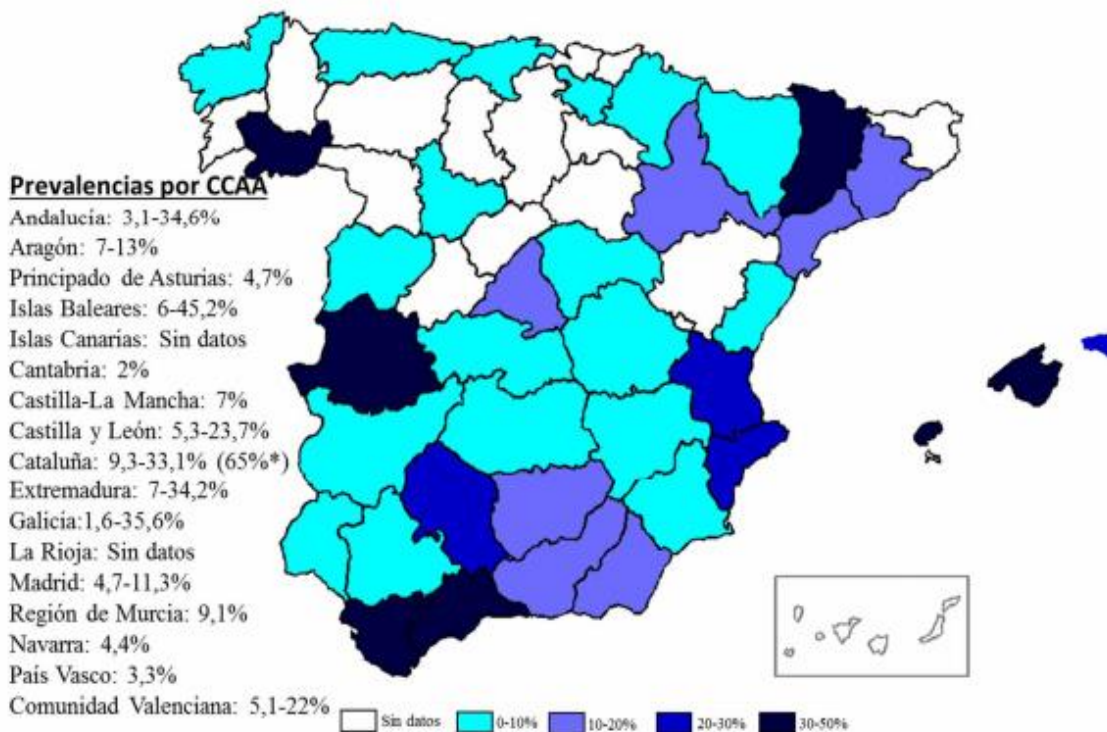


Figura 15. Prevalencia de *Leishmania infantum* en perros en España. Fuente y diseño de Bravo-Barriga, D. (2017) con los datos revisados por: Gálvez (2011); Morales-Yuste, (2012); Miró *et al.* (2012), Hernández Martínez (2016). *Solano-Gallego *et al.* (2006).

1.6. Factores que condicionan la distribución espacio-temporal de los flebotomos y la leishmaniosis

El aumento de **la temperatura** como consecuencia del cambio climático es uno de los factores que favorecen la dispersión del vector, está relacionada con el acortamiento del desarrollo larvario y por extensión aumenta su periodo de actividad aumentando el riesgo de infección (Cross y Hyams., 1996; Sutherst, 2004; Boussaa *et al.*, 2005; Fischer, 2010; Iriso-Calle *et al.*, 2017). Los expertos han predicho un aumento de la temperatura entre 1.5 °C a 4.5 °C hasta el final del siglo actual (Aspöck *et al.*, 2008) y la presencia y abundancia de vectores en distintas zonas geográficas y épocas del año está cambiando dando lugar a la aparición de nuevos nichos ecológicos (Koch *et al.*, 2017). Se han utilizado sistemas de información geográfica (SIG) y métodos de análisis de datos espaciales

avanzados para predecir la propagación de especies de flebotomos a nuevos entornos (Gálvez *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2011, Alkan *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2018). En España, el aumento de la leishmaniosis canina en el pirineo catalán (Lérida) se encuentra relacionada con la expansión de *P. ariasi* (Ballart *et al.*, 2012), y también este es el caso en la provincia de Álava (Aransay *et al.*, 2004). En el centro de España se detecta asimismo un aumento en la distribución y en las densidades de *P. perniciosus* respecto a estudios anteriores (Galvez *et al.*, 2011) y también en el caso del sureste español (Martín-Sánchez *et al.*, 2009). Una investigación sobre el cambio climático y el riesgo de aparición de flebotomos en Austria observó un aumento y dispersión de los vectores en algunas partes de ese país debido al aumento de la temperatura, exactamente fueron capaces de predecir que el aumento de 1°C en la temperatura en enero y julio podría conducir a condiciones adecuadas para *Phlebotomus mascitti* y *Phlebotomus neglectus* (Aspöck *et al.*, 2008).

Además de la temperatura **otros factores medioambientales** que afectan a la presencia, distribución y abundancia de flebotomos son la precipitación y humedad, la orientación de la zona, la vegetación predominante, los tipos de suelo, la proximidad al ganado y otros factores (Rioux *et al.*, 1969; Killick-Kendrick y Killick-Kendrick, 1999; Galvez *et al.*, 2011; Alcover *et al.*, 2014; Badakhshan *et al.*, 2018). Los parámetros biogeográficos tienen un gran impacto en la distribución y densidad de las especies (Zhioua *et al.* 2010, Farees *et al.* 2015). Las inclemencias climáticas, como las fuertes lluvias o las rachas fuertes de viento, son otro factor que afectan negativamente actividad de los flebotomos ya que disminuyen el rango de vuelo y afectan a su dinámica estacional (Alten *et al.*, 2016; Ayhan *et al.*, 2017).

La **distribución altitudinal y las necesidades climáticas** varían entre especies de flebotomos (Killick-Kendrick, 1999; Aransay *et al.*, 2004; Guernaoui *et al.*, 2006, Belén y Alten, 2011; Alten *et al.*, 2015). En Europa, la distribución altitudinal de *P. ariasi* varía de 10 m a 2613 m con tendencia a ser capturado a mayores altitudes y en latitudes más australes (Rioux *et al.*, 1969; Martínez-Ortega, 1985b; Franco *et al.*, 2010) mientras que *P. perniciosus* ocupa sitios desde el nivel del mar hasta 1534 m (Rioux *et al.*, 1969; Barón *et*

al., 2011) En Andalucía se ha observado una abundancia relativa del 0.28% para *P. ariasi* en Rio Tinto (oeste) mientras que en Las Sabinas (Sierra Nevada), un pueblo situado a 1650 m de altitud se registró una abundancia del 90.9% de esta misma especie (Franco *et al.*, 2010). EL registro de LCan en la zona cercana de La Alpujarra, encontró mayor seroprevalencia (15.4%) en aquellas zonas cuyo rango de altitud oscilaba entre 600 y 900 m sobre el nivel del mar. Otros estudios relacionan seroprevalencias con altitud, por ejemplo, en el realizado en Murcia por Pérez-Cutillas *et al.* (2015) se encontró una menor prevalencia de LHum a mayores altitudes argumentando que en estas zonas las temperaturas mínimas son más frías y las máximas más altas que en zonas de menor altitud, lo que podría afectar a la supervivencia del vector.

Las especies pueden tener **macrohábitats preferenciales** en base a las características ambientales. A diferencia de *P. ariasi* que abunda en las zonas más frías, montañosas y húmedas de la parte occidental de la Cuenca mediterránea, como en la mitad norte de España y el sur de Francia (Miró y Molina, 2006), *P. perniciosus* está ampliamente distribuido en la geografía española, siendo capaz de tolerar condiciones ambientales muy diversas y actuando por tanto como el principal vector de la leishmaniosis en nuestro país (Gálvez *et al.*, 2010; Barón *et al.*, 2011; Ballart *et al.*, 2012). Los estudios llevados a cabo por Gálvez *et al.*, (2010) en España relacionan mayor abundancia del vector con hábitats rurales, pueblos y bordes de los pueblos mientras que Rioux *et al.* (2013) define a las zonas periféricas y suburbanas del sur Europa como aquellas de mayor riesgo de infección de LV y focos importantes del vector, donde los pequeños jardines fomentan el desarrollo de *P. ariasi* y *P. perniciosus*. En Murcia se observa que la mayoría de los donantes infectados provienen de pueblos y ciudades con baja densidad poblacional lo que sugiere que la mayoría de las personas en Murcia que viven en comunidades urbanas más grandes pueden no estar infectadas (Pérez-Cutillas *et al.*, 2015) Por lo que respecta a la seroprevalencia de LCan estudiada por Goyena *et al.* (2016) en distintas zonas de Murcia, los perros más afectados se encuentran en aldeas rurales (21%), huertos periurbanos (23%), ranchos aislados (28%) y casas de campo (29%).

De la misma manera en la provincia de Lérida el riesgo de seropositividad en perros disminuía en aquellos que vivían en zonas urbanas o periurbanas (Ballart *et al.*, 2012). La rápida transformación de zonas rurales y agrícolas en urbanas, donde las prácticas agrícolas y el consiguiente cuidado de la tierra ha dado paso a terrenos ecológicamente degradados, y la conversión de espacios naturales en espacios urbanos o artificialmente modificados, han contribuido a la reducción de la diversidad de especies existentes, pudiendo provocar la proliferación de vectores y/o reservorios zoonóticos (Martín Sánchez *et al.*, 2009; Ballart *et al.*, 2012). En el caso de la especie *S. minuta* tiende a descansar entre rocas pequeñas, mientras *P. mascitii* tiene una preferencia especial por el hábitat que incluye principalmente cuevas (Grimm *et al.*, 1993, Alten *et al.*, 2015). Por otra parte, en Europa, la presencia de *P. langeroni* solo se ha descrito casi siempre cerca de madrigueras de conejos (Martínez Ortega *et al.*, 1992, Lucientes *et al.*, 1994; Aransay *et al.*, 2004). Sin embargo, esta especie de flebotomo no se ha encontrado hasta la fecha en otras zonas de España excepto en Murcia (Martínez Ortega *et al.*, 1996; Barón *et al.*, 2011; Sáez *et al.*, 2018). Otro caso utilizado como ejemplificación es el asociado a la biología de la especie *P. argentipes* cuya preferencia alimentaria está relacionada con la savia de árboles de banano, por lo que hábitats con gran densidad de este tipo de vegetación están asociadas positivamente a la abundancia del vector (Poché *et al.*, 2017).

Otros **factores topográficos** y no directamente relacionados con el medioambiente pueden provocar cambios en la distribución altitudinal y/o latitudinal de los vectores. Por ejemplo, las elevaciones de terreno pueden constituir una barrera física para su expansión (Cook, 1992; Fischer *et al.*, 2010; 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 la adaptación de los flebotomos a microambientes antrópicos (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. Un

ejemplo es el descrito en La reserva natural del Santuario de Caraça (Brasil) por Tonelli *et al.* (2017) donde se relaciona el aumento en la incidencia de la infección a la presión ambiental ejercida por las personas por un aumento del ecoturismo que facilita el contacto vector-humano y un mayor contacto entre vector y los reservorios debido a la reforestación en los municipios vecinos donde la LCan y LHum es endémica. La llegada de nuevas especies de Leishmania y, en concreto, de *L. tropica* y *L. donovani* (Dujardin *et al.*, 2008), la primera de ellas presente en el norte de África (Rispaill *et al.*, 2002), es uno de los aspectos que podrían complicar la situación de la leishmaniosis en España en el futuro, ya que se encuentran presentes los vectores competentes, que podrían ver aumentada sus poblaciones debido a cambios producidos por uno o varios de los factores recopilados en este apartado. La llegada de *L. major*, también presente en el norte de África, parece más complicada al no estar presente en la Península su principal reservorio (Ready, 2010).

1.7. Fenología y actividad diaria de los flebotomos y estacionalidad de la leishmaniosis en España

La dinámica en las poblaciones de flebotomos es típicamente estacional (Ayhan *et al.*, 2017) y el factor determinante del inicio y final de la actividad de estos vectores es la temperatura (Alten *et al.*, 2016; Calle *et al.*, 2017). Los flebotomos adultos precisan temperaturas medias diarias de al menos 15°C para su actividad entrando en diapausa durante los periodos del año con temperaturas medias inferiores (killick-kendrick y Killick-Kendrick, 1999; Alexander, 2000; Maroli *et al.*, 2013). En el Mediterráneo, la temperatura media de los focos de leishmaniosis se encuentra entre los 20 °C y 30°C en julio y entre los 5 °C a 10 °C en enero (Ashford y Bettini, 1987). Estas temperaturas son óptimas para el desarrollo de las poblaciones de *P. perniciosus* y *P. ariasi* (Prudhomme *et al.*, 2015). En especies mantenidas en laboratorio a temperaturas bajas, un período de diapausa puede durar incluso 9 meses, y solo después de que la temperatura sube a 15°C, las larvas L4 se convierten en pupas y los adultos emergen en dos o tres semanas posteriores (Volf *et al.*, 2011). La emergencia de adultos en condiciones naturales de exposición se ha descrito en

el área mediterránea entre los meses de abril, mayo y junio relacionándolo con las primeras capturas. Concretamente en el caso *P. tobbi* y *P. neglectus* aparecían a principios de abril en latitudes sur del Mediterráneo (35° N aproximadamente) además de *P. perniciosus*, que se describe el mismo comportamiento en zonas de Túnez (Dancesco *et al.*, 1970), Almería (Morillas-Márquez *et al.*, 1991) y Catania (Lisi *et al.*, 2014). Por otro lado, la actividad del final de actividad de los adultos ocurre durante los meses de septiembre a noviembre, según la latitud y la temperatura media anual (Alten *et al.*, 2016).

Es necesario estudiar la dinámica estacional de los flebotomos de una zona durante varios años para obtener un patrón estacional preciso (Alten *et al.*, 2016). El vector *P. ariasi* en muchas zonas de Europa presenta una dinámica monomodal con un pico de actividad descrito entre los meses de junio y julio, como se ha observado en Francia, Georgia y el norte de España (Lucientes *et al.*, 1991; Giorgobiani *et al.*, 2012; Rioux *et al.*, 2013; González *et al.*, 2017b) pero en cambio es bimodal en el sur de España, con un pico en junio/julio y otro en septiembre/octubre (Gil-Collado *et al.*, 1989). Respecto a *P. perniciosus*, en el centro de España se ha descrito un patrón bimodal confluyente que abarca el periodo de junio-julio/septiembre (González *et al.*, 2017b), también descrito el mismo patrón en otros estudios en la Península Ibérica como en Zaragoza (Lucientes *et al.*, 1991), zona central de Portugal (Branco *et al.*, 2013) y en las islas de Mallorca (Lladó y Rotger, 1990), Ibiza y Formentera (Molina *et al.*, 2005). Por otra parte, en el sur peninsular *P. perniciosus* presenta un patrón bimodal con picos durante los meses de Julio y septiembre como en el sur Portugal (Maia *et al.*, 2009), Granada (Morillas-Márquez *et al.*, 1983) y Almería (Sanchís-Marín *et al.*, 1986), que coinciden con la fenología descrita en Túnez (Croset *et al.*, 1970). Según el autor Gil-Collado *et al.* (1989) la especie *P. papatasi* presenta una curva con dos máximos, asemejándose a la descrita en *P. perniciosus* con un pico al final de la primavera/principio de verano y otro al final de verano/comienzos de otoño. Dentro del subgénero *Sergentomyia*, la especie *S. minuta* sigue a lo largo del año una distribución monofásica y que coincide, en líneas generales, a la dinámica descrita en

Francia, Italia y sureste de España (Rioux *et al.*, 1967; Maroli y Bettini, 1977; Martínez-Ortega, 1984). En el caso de la dinámica descrita en el brote de Madrid el pico de abundancia para *S. minuta* se produjo en el mes de agosto durante tres periodos de actividad distintos (González *et al.*, 2017a). Por tanto y en base a lo descrito en este párrafo, las épocas de máximo riesgo de transmisión de las enfermedades transmitidas por estos insectos serían finales de junio y principios de julio y sobre todo a finales de septiembre y principios de octubre (Lucientes, 2005), periodos donde la abundancia de flebotomos es mayor (Fig. 16).

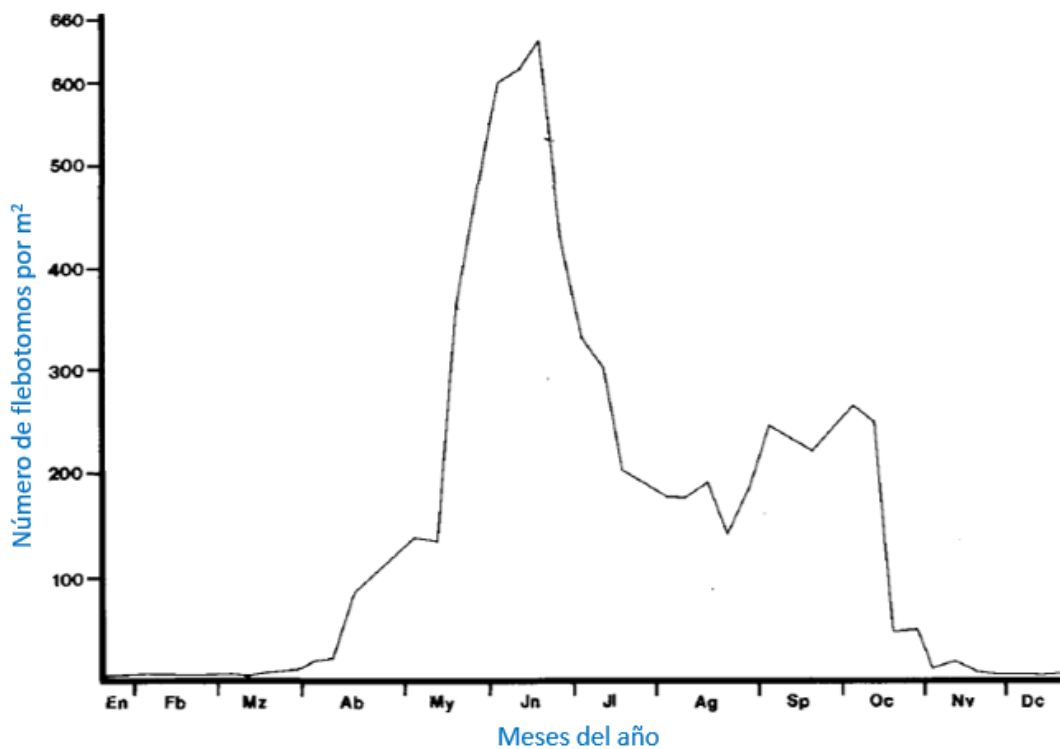


Figura 16. Fenología general de los flebotomos en el Sureste español. Fuente: Martínez-Ortega y Conesa-Gallego (1987) y modificada por Risueño Iranzo, J.

Según los estudios realizados por Martínez-Ortega y Conesa-Gallego (1987) en Murcia y Almería, los flebotomos colonizan hábitats de entre 0 metros y 2.168 metros de altitud y la mayor parte se encuentran entre 0-500 m. Las altitudes menores de 0-100m están ocupadas, preferentemente, por *P. papatasi*, especie característica de las zonas más secas. Por encima de los 400 m ya no aparece la especie *P. chabaudi* y a más de 500 m. no se encuentra *P. alexandri*. En las altitudes intermedias (100-500 m.) se capturan especies

de zonas semiáridas incluidas *P. perniciosus*, *P. longicuspis* y *S. minuta*. A partir de 800 m. de altitud solamente aparecen 4 especies: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti* y *S. minuta*, y por encima de los 1.200 m. solamente *P. ariasi* y *P. perniciosus* y ésta última se ha localizado a una altitud máxima de 1.450 m.

Los flebotomos son sensibles a la desecación y su actividad diaria para alimentarse, aparearse, buscar hospedadores y realizar la oviposición comienza con el crepúsculo y hasta el amanecer, cuando la temperatura es más baja y la humedad relativa más alta. Las temperaturas a las que tienen actividad están comprendidas entre 15°C y 28°C, y la humedad relativa tiene que oscilar entre 60 y 100%, según un estudio de *P. ariasi* en el Valle del Ebro (Lucientes *et al.*, 2005). El periodo principal de máxima actividad de las especies de flebotomos en la Cuenca mediterránea se encuentra entre las 11 p.m. y las 2 a.m. (Alten *et al.*, 2016). En Murcia la especie *P. sergenti* permanece activa desde principios de la tarde encontrándonos con dos picos de actividad, el primero entre las 9:30 p.m. y las 10:30 p.m. y otro entre las 1:30 a.m. y las 2:30 a.m. de la mañana. Por otro lado, *P. perniciosus* comienza su actividad a finales de la tarde encontrándonos dos picos de abundancia semejantes a la especie anteriormente descrita. En sendos casos, el periodo final de actividad finaliza a las 6.30 a.m. (Romera-Lozano y Martínez-Ortega, 1998).

1.8. Control de la Leishmaniosis por *L. infantum* en la Cuenca Mediterránea

Aún no existe una vacuna frente a *Leishmania* spp. de elevada eficacia para prevenir la infección y el desarrollo de la enfermedad en personas o animales. El control de la Leishmaniosis causada por *L. infantum* en España y otros países se centra fundamentalmente en actuaciones sobre el perro empleando simultáneamente varias medidas entre las que se incluyen la aplicación de insecticidas con actividad residual para prevenir la picadura del artrópodo, el tratamiento de los animales enfermos con fármacos frente al parásito y productos que afirman estimular en el animal una respuesta inmunológica protectora y más recientemente, mediante la administración de vacunas

cuya eficacia es parcial o aún está por demostrar (Miró *et al.*, 2017). Ninguna de estas medidas es completamente eficaz bien individualmente o empleadas de manera simultánea.

1.8.1. Empleo de insecticidas con actividad residual

Al contrario que con los mosquitos, la aplicación de insecticidas en el medio ambiente para evitar la reproducción de los flebotomos no es una opción de control útil ya que crían y reposan en lugares terrestres mal caracterizados y el control del vector ambiental se restringe a medidas en el ambiente peridoméstico poco extendidas. Por el contrario, el empleo de insecticidas en el perro que permanecen activos en el animal durante varias semanas o meses (elevada actividad residual), es la medida de control más utilizada y su eficacia se mide en función de su actividad repelente (capacidad para evitar la picadura) e insecticida (tasa de mortalidad en flebotomos expuestos al producto). En Europa los únicos productos insecticidas autorizados para el control de la LCan son formulaciones tópicas en solución (pipetas) o collar, a base de piretroides sintéticos. Sin embargo, su eficacia no es del 100%. En condiciones laborales controladas, la actividad repelente de las soluciones durante las 3 semanas tras su aplicación es próxima al 90% y su actividad insecticida oscila entre el 30-99% (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Mencke *et al.*, 2003; Miró *et al.*, 2007a; Molina *et al.*, 2012a). La actividad residual de las soluciones disminuye drásticamente a partir de la tercera o cuarta semana según el producto y es más duradera en los collares impregnados con insecticida y los fabricantes de éstos sostienen que son eficaces entre 6 y 8 meses según el producto (Reithinger *et al.*, 2001; Ferroglio *et al.*, 2008; Maroli *et al.*, 2010; Britani *et al.*, 2014). Sin embargo, la pérdida de collares es un problema práctico importante y la eficacia de las pipetas se ve afectada por factores externos tales como una incorrecta aplicación de la misma y la eliminación del producto con el contacto con el agua. El hecho de que pocos dueños de perros sean conscientes de las limitaciones de los productos insecticidas frente a flebotomos podría ser el motivo de que la seroprevalencia de CanL en perros de compañía

en el sureste de España sea similar en animales tratados y no tratados (Goyena *et al.*, 2016).

Cuando los tratamientos se aplican en condiciones experimentales de campo controladas pueden reducir la seroprevalencia de LCan entre un 50-100% según los productos y los años (Maroli *et al.*, 2001; Foglia Manzillo *et al.*, 2006; Otranto *et al.*, 2007, 2010; Ferroglio *et al.*, 2008). Actualmente en España solamente hay tres productos insecticidas comerciales autorizados frente a la leishmaniosis incluidos, el collar “Scalibor” (deltametrina 40 mg/g; MSD®), y las pipetas “Advantix” (permetrina 500 mg/ml e imidacloprid 100 mg/ml; Bayer®) y “Exspot” (permetrina 715 mg/ml; MSD®).

Además de las soluciones y collares insecticidas, los insecticidas de acción inmediata pero escasa actividad residual también ofrece buenas propiedades repelentes. Los más comunes son los aerosoles que incluyen piretroides exclusivamente o combinados con otros productos de buena actividad frente a otros ectoparásitos como las pulgas y garrapatas (Reithinger *et al.*, 2001; Molina *et al.*, 2001; Molina *et al.*, 2006). Algunos autores señalan que la actividad residual de los aerosoles fue de 1 a 2 semanas (Molina *et al.*, 2006) o incluso 2 a 4 semanas según el producto y la edad de los animales (Mercier *et al.*, 2003). Por lo general, los aerosoles se recomiendan para periodos de exposición corta.

Por otro lado, existen compuestos naturales o aceites esenciales con actividad repelente frente a insectos, aunque hay pocos estudios de eficacia contrastada frente a flebotomos. Muller *et al.* (2008) señalaron una baja eficacia repelente del extracto de citronela y el geraniol, mientras que el estudio reciente de Kimutai *et al.* (2017) describe un alto efecto repelente de aceites esenciales extraídos de Citronela (*Cymbopogon citratus*) frente a *P. duboscqi*.

La utilización de insecticidas sistémicos de última generación en los perros pueden ser una nueva herramienta complementaria para controlar la LV zoonótica en países endémicos. Un estudio realizado por Gómez y Picado (2017) sugiere la utilización de estos

productos en perros, en especial las isoxazolinas de administración oral (spinosad, fluralaner, afoxolaner, sarolaner) y algunas lactonas macrocíclicas tópicas (moxidectina), ambos con una actividad residual larga.

1.8.2. Inmunoprofilaxis

El tratamiento de perros infectados reduce la carga de parásitos y el riesgo de transmisión a los flebotomos en gran medida, pero como ya se ha explicado se piensa que rara vez se consigue eliminar al parásito completamente, que permanece latente en los macrófagos bajo control inmunitario (Travi *et al.*, 2018). El sacrificio de los perros infectados, medida empleada en Brasil para el control de la LHum, no es socialmente aceptable en Europa y además su eficacia es variable y en general escasa (Werneck *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2017). Por otro lado, en el foco de LHum de Fuenlabrada el estudio realizado por Sevá *et al.* (2017) confirmó que el sacrificio de liebres y conejos, fue la mejor medida adoptada, ya que disminuyó la proporción de todos los hospedadores infectados.

En estas circunstancias, la búsqueda de una vacuna que proteja contra el desarrollo de la enfermedad es una prioridad en el control de LCan (Otranto *et al.*, 2013). Hasta la fecha, se han comercializado cuatro vacunas para perros, dos en Brasil: Leishmune® en 2004 y Leish Tec® en 2008, y dos en Europa: CaniLeish® en 2011 y LetiFend® en 2016. Las tres primeras incluyen un adyuvante de saponina y la última no contiene adyuvantes.

Leishmune® se basa en una glucoproteína ligando de fucosa-manosa (FML) de *L. donovani* como antígeno y cuando se analizó su eficacia en perros expuestos naturalmente durante más de 41 meses, 1/44 perros vacunados y 7/41 perros no vacunados desarrollaron LCan (Borja-Cabrera *et al.*, 2002). En un ensayo experimental con la vacuna Leish-Tec® que contiene el antígeno recombinante A2 de *L. chagasi* (syn. *L. infantum*), 2/7 y 5/7 perros vacunados y no vacunados, respectivamente, desarrollaron la enfermedad (Fernandes *et al.*, 2008).

Varios ensayos de exposición natural y experimental han proporcionado información sobre la eficacia de CaniLeish®, una vacuna elaborada con proteínas secretadas/excretadas de *L. infantum* (LiESAp) y el adyuvante QA-21. Tras una infección experimental con promastigotes, 7/10 de los controles no vacunados y 3/10 de los vacunados desarrollaron una infección activa (Martin *et al.*, 2014). En un ensayo de infección natural en 90 perros de raza Beagle de 2 años de duración la proporción de perros con infecciones activas fue 13/39 en los controles y 5/41 en el grupo vacunado con CaniLeish® (Oliva *et al.*, 2014). Desde su comercialización, CaniLeish se ha utilizado ampliamente en España, sin embargo, la mayoría de los veterinarios informaron que con frecuencia se acompaña de efectos anafilácticos locales o sistémicos (Lladró *et al.*, 2018).

La otra vacuna comercial disponible en Europa es LetiFend® basada en la proteína Q quimérica (Soto *et al.*, 1998). La vacunación resultó en la eliminación del parásito en 6/7 en comparación con 1/7 de los perros vacunados y no vacunados, respectivamente (Carcelén *et al.*, 2009). En un ensayo de exposición natural de dos años en España y Francia, 19/186 controles y 8/171 vacunados presentaron leishmaniosis clínica confirmada, pero las diferencias entre los controles y los vacunados fueron significativas solo en perros de España (Solano-Gallego, 2017). Esta vacuna tiene la novedad de permitir la diferenciación entre animales vacunados y no vacunados, ya que no interfiere con las pruebas serológicas más comúnmente utilizadas. Además, el calendario de vacunación incluye una dosis única y la vacuna no contiene un adyuvante, causante en muchos casos de los efectos secundarios no deseados.

Se puede concluir de los resultados anteriores que la vacunación con proteínas específicas del parásito proporciona una protección significativa en algunos casos y que los signos clínicos en los perros vacunados son generalmente más leves que en los homólogos no vacunados. En cualquier caso, un aspecto crucial a tener en cuenta en los estudios de eficacia de las vacunas es que una proporción importante de los perros controla la infección de forma natural elaborando una respuesta inmunológica protectora de carácter celular (Moreno y Alvar, 2002; Giunchetti *et al.*, 2008a; Giunchetti *et al.*,

2008b; Kedzierski, 2010). Oliva *et al.* (2014) calculan una eficacia para CaniLeish® del 68% empleando la siguiente fórmula: $(\% \text{ controles sintomáticos} - \% \text{ de vacunados sintomáticos}) / \% \text{ de controles sintomáticos} * 100$.

1.8.3. Otras medidas de control

Existen medidas adicionales a las anteriores para controlar la Leishmaniosis en el ambiente doméstico, basadas en reducir la exposición a los flebotomos. Entre ellas se incluye la protección de ventanas y puertas de hogares, refugios o perreras mediante el uso de mallas con un tamaño que varía entre 0.3 y 0.4 mm (Sharma y Singh, 2008; Faiman *et al.*, 2009b) y funciona como barrera mecánica. Además, la eliminación de posibles lugares de cría (por ejemplo, acumulaciones de compost, restos de podas, papeleras y pilas de madera) y áreas favorables cerca de zonas habitadas es importante para disminuir el riesgo por picadura (Molina *et al.*, 2001; Maroli & Khoury, 2004). El uso de mosquiteras en las camas y ventanas, especialmente si se tratan con insecticidas reduce de LHum en zonas endémicas de Asia y África, aunque su uso en Europa está poco extendido (Basimike *et al.*, 1995; Quinnell & Courtenay 2009; Faiman *et al.*, 2009b). Por último, mantener a los perros en el interior desde el atardecer hasta el amanecer, temporadas de alto riesgo donde las hembras de flebotomo salen en búsqueda de sangre para alimentarse, también es importante para prevenir la infección (Martín-Sánchez *et al.*, 2009; Alten *et al.*, 2016).

1.9. Detección de anticuerpos frente a antígenos salivares de los flebotomos para estimar la exposición a flebotomos y eficacia de tratamientos insecticidas

1.9.1. Volumen, composición y función hemostática de la saliva

El volumen de saliva contenido en un par de glándulas salivales se estima que es de 35 nl (Adler & Theodor, 1926). La composición de la saliva de los flebotomos difiere no solo

entre las especies (Volf *et al.*, 2000), sino también entre las poblaciones de zonas geográficas distintas (Warburg *et al.*, 1994, Ramalho-Ortigão *et al.*, 2015). En condiciones laboratoriales el contenido protéico de la saliva difiere incluso entre colonias de la misma especie, el mantenimiento de las mismas y la sensibilidad de los métodos de medición de la concentración de proteínas (Cerna *et al.*, 2002), que oscila entre 0,18 y 0,8 µg/glándula (Abdel-Badei *et al.*, 2012). En las hembras, la concentración de proteína de la saliva es más alta y el contenido más complejo que en los machos, lo que refleja diferentes estrategias de alimentación (Volf *et al.*, 2000; Rohoušová y Volf, 2006). Por ejemplo, la concentración de proteínas salivares de *P. duboscqi* fue casi 30 veces mayor en el caso de las hembras en comparación con los machos (Volf *et al.*, 2000). Al mismo tiempo el número de componentes de proteínas aumenta gradualmente con la edad de las hembras, alcanzando el patrón electroforético completo de un adulto en 3 o 5 días después de la emergencia en colonias mantenidas a 26 ° C y a temperatura ambiente, respectivamente (Charlab *et al.*, 1999).

En los insectos hematófagos la saliva, además de lubricar, limpiar las piezas bucales y ayudar en la digestión de azúcares y sangre, contiene una serie de sustancias bioactivas que modifican la respuesta homeostática e inmune del hospedador en el lugar de la picadura para poder asegurar el éxito de la ingurgitación de sangre (Krenn y Aspöck, 2012). Concretamente, durante la hematofagia, los flebotomos tienen que hacer frente a los tres grandes eventos de la hemostasia: agregación plaquetaria, vasoconstricción y coagulación sanguínea, para lo que inyectan la saliva en el lugar de la picadura, contrarrestando así estos efectos (Fontaine *et al.*, 2011; Rochael *et al.*, 2013).

La agregación plaquetaria es la primera línea de defensa para evitar pérdidas de sangre durante un proceso hemorrágico. Las plaquetas se activan por diversos agonistas incluyendo trombina, colágeno y ADP que finalmente se agregan formando el trombo plaquetario. La mayoría de los insectos hematófagos inhibe la agregación plaquetaria mediante la acción de las apirinas salivales. Las apirinas de la familia Cimex se han identificado en flebotomos del VM, concretamente en *P. papatasi* y *P. duboscqi* y juega un

papel importante en la alimentación de estos vectores (Valenzuela *et al.*, 2001; Hamasaki *et al.*, 2009).

Los vasodilatadores salivales pueden actuar, directa o indirectamente, sobre las células del músculo liso, activando enzimas intracelulares que finalmente desembocan en la producción de AMPc ó GMPc causando vasorrelajación. Entre flebotomos del Nuevo Mundo (*Lutzomyia* spp.) y *Nyssomyia* spp poseen maxadilano, un potente vasodilatador, a diferencia de las especies del género *Phlebotomus* que carecen de él, pero tienen adenosina y AMP que ejercen la función de vasodilatación (Champagne y Ribeiro, 1994; Valenzuela *et al.*, 2002).

En los mosquitos los anticoagulantes salivales bloquean este proceso a diferentes niveles de la cascada, mediante la anofelina en *An. albimanus* o inhibidores del factor Xa de tipo serpina en *Ae. aegypti*. En flebotomos, fundamentalmente encontramos apirasas, 5' nucleotidasas (Ribeiro, 1987; Ribeiro y Francischetti, 2003) o las proteínas recién descritas en *L. longipalpis*, lufaxina y lundep (Collin *et al.*, 2012; Chagas *et al.*, 2014).

En la saliva también hay compuestos con actividad analgésica y antiinflamatoria (Ribeiro, 1987) y generalmente los insectos hematófagos poseen más de una molécula que cumple la misma función con el objetivo final de asegurar el éxito de la alimentación sanguínea (Francischetti *et al.*, 2005).

1.9.2. Respuesta inmunológica frente a la saliva de flebotomo por parte del hospedador

Las interacciones saliva-hospedador no son iguales para todos los artrópodos y están altamente relacionadas con los mecanismos y la duración de la hematofagia. En el caso de los flebotomos, la interacción con el hospedador es breve y la respuesta inmune frente a la saliva puede incluso representar una ventaja para el flebotomo, favoreciendo la succión de la sangre (Belkaid *et al.*, 2000). Se desencadena en el hospedador una respuesta inmune humoral con producción de anticuerpos específicos frente a las

proteínas de la saliva, según se ha comprobado experimentalmente y en condiciones naturales en personas y animales (Fig. 17) (Belkaid *et al.*, 1998; Rohoušová *et al.*, 2005; Bahia *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007; Hostomská *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2010; Vlková *et al.*, 2012; Vlková *et al.*, 2014; Geraci *et al.*, 2014).

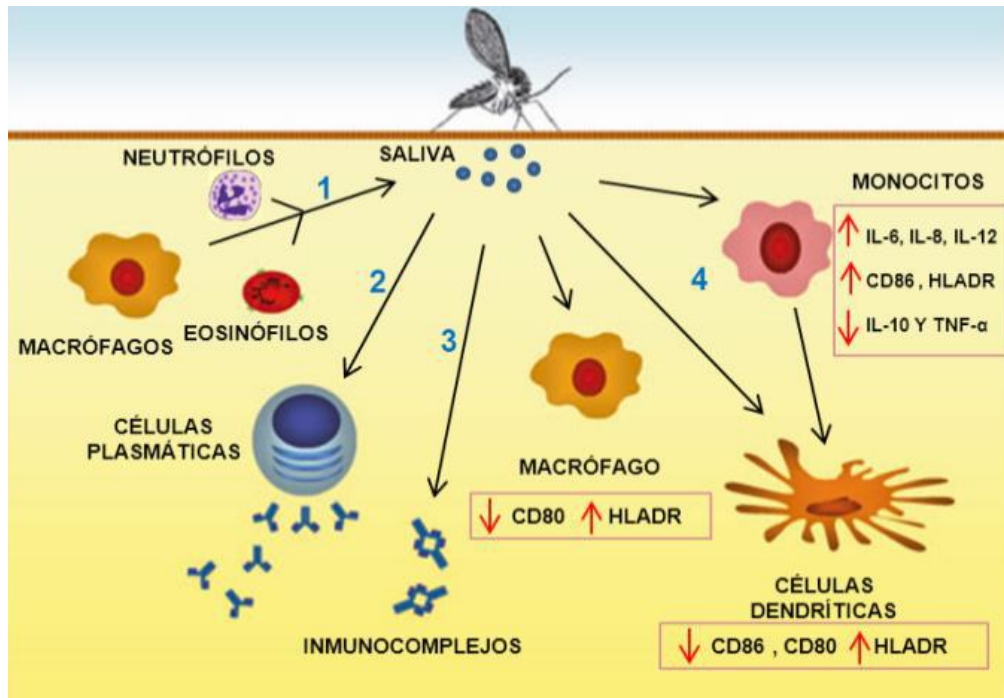


Figura 17. Efectos de la saliva de *L. longipalpis* sobre el sistema inmune de un hospedador vertebrado. 1) Infiltración de células inflamatorias. 2) Producción de anticuerpos frente a las proteínas salivales. 3) Formación de inmunocomplejos en la fase temprana. 4) Modulación de la liberación de citoquinas y producción de moléculas coestimuladoras por las células presentadoras de antígeno. Fuente: Andrade *et al.* (2007) y modificada por Martín-Martín (2014)

En ratones, la exposición continuada a las picaduras de flebotomos o a homogeneizado de glándulas salivares (HGS), resultó en un aumento de anticuerpos IgG anti-saliva, principalmente la subclase IgG1 (Silva *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Martín-Martín *et al.*, 2015). Por lo general, los perros desarrollan anticuerpos detectables en suero entre las 2 o 4 semanas tras la exposición a los flebotomos y sus niveles se correlacionan positivamente con el número de flebotomos que les pican (Hostomska *et al.*, 2008; Vlkova *et al.*, 2011; Drahota *et al.*, 2014; Martín-Martín *et al.*, 2014). Dependiendo de la especie de flebotomo estudiada, se observó un aumento de IgG1 e IgE anti-saliva después de la exposición frente a *L. longipalpis* y, en el caso de exposición a *P.*

perniciosus se observó un rápido aumento de IgG anti-saliva, concretamente de IgG2 mientras que la IgG1 se detectó más tarde, pero se mantuvo durante más tiempo (Vlkova *et al.*, 2011). Sin embargo, solo la IgG2 se relaciona con la intensidad de exposición frente a los flebotomos (Hostomska *et al.*, 2008; Collin *et al.*, 2009). En humanos, la respuesta humoral frente a la saliva de los flebotomos puede diferir según las poblaciones de hospedadores y las especies de flebotomos. Por ejemplo, la respuesta frente a la saliva de *P. papatasi* en niños en Túnez incluyó IgG4, IgG2 e IgG1 (Marzouki *et al.*, 2011). Por otro lado, estudios llevados a cabo por Carvalho *et al.* (2015) observaron una respuesta humoral con la presencia de IgG1 e IgG4 y ausencia de IgE.

La estacionalidad de los flebotomos afecta a la cinética de anticuerpos anti-saliva en el hospedador, tal y como describen trabajos realizados en ratones (Vlkova *et al.*, 2012; Martín-Martín *et al.*, 2015), humanos (Clements *et al.*, 2015), conejos (Martín-Martín *et al.*, 2015) y perros (Hostomska *et al.*, 2009; Vlkova *et al.*, 2011; Kostalova *et al.*, 2015). En el caso de humanos, los anticuerpos específicos disminuyeron significativamente 30 días después de la exposición a los flebotomos, aunque persistieron en niveles bajos durante 5 meses (Clements *et al.*, 2010). En el caso de perros y ratones expuestos a las picaduras de *L. longipalpis* y *P. papatasi* se detectó una respuesta de anticuerpos anti-saliva incluso después de 6 meses (Hostomska *et al.*, 2009; Vlkova *et al.*, 2012), al contrario que en perros expuestos a *P. perniciosus*, en cuyos sueros se observó una drástica disminución 1 semana después de la exposición al vector (Vlkova *et al.*, 2011). Además, los estudios longitudinales en perros naturalmente expuestos al vector mostraron que los anticuerpos desarrollados contra la saliva siguen un patrón estacional que se correlaciona con los periodos de mayor abundancia del flebotomo (Kostalova *et al.*, 2015). En humanos, la reexposición a *L. longipalpis* o *P. argentipes* después de 1 año o 6 meses, genera un aumento significativo de los niveles de anticuerpos (Vinhas *et al.*, 2007; Clements *et al.*, 2015) lo que indica una respuesta de memoria de anticuerpos a la saliva para ambas especies. También se observó el mismo efecto sobre ratones y conejos expuestos a *P. perniciosus* (Vlkova *et al.*, 2012; Martín-Martín *et al.*, 2015).

Además de la respuesta humoral, la saliva de los flebotomos induce una **respuesta inmune celular** de hipersensibilidad retardada (DTH), caracterizada por la infiltración de células proinflamatorias (neutrófilos, eosinófilos y macrófagos) en el lugar de la picadura, que puede persistir hasta 48 h (Belkaid *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2014). Tras el procesamiento antigénico de las proteínas salivares en las células dendríticas de la piel, se produce la activación y expansión clonal de células T que, tras un nuevo contacto con el antígeno, se congregan en la zona de la picadura, donde comienzan a secretar citoquinas proinflamatorias (Ribeiro y Francischetti, 2003). Esta potente respuesta celular es conocida tradicionalmente en Oriente Medio como “harara” en referencia a los efectos producidos por la picadura de *P. papatasi* sobre la piel humana (Theodos, 1935). En ratones previamente sensibilizados con la saliva de *P. papatasi*, un nuevo contacto con esta causa infiltración celular compuesta mayoritariamente por linfocitos CD4+, monocitos/macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Belkaid *et al.*, 1998; Belkaid *et al.*, 2000). En *P. duboscqi*, la caracterización del reclutamiento celular en el lugar de la picadura en ratones previamente expuestos a sus picaduras destaca también la presencia de células NK y monocitos Gr+ (células productoras de Granzima) (Teixeira *et al.*, 2014). En experimentos *in vitro* se han demostrado las propiedades quimioatrayentes de la saliva de *Phlebotomus* spp. sobre monocitos de ratón (Zer *et al.*, 2001).

Paradójicamente, los flebotomos aprovechan esta respuesta inmune del hospedador para alimentarse más rápidamente, ya que el flujo sanguíneo es mayor en lugares de la piel que presentan una respuesta DTH (Belkaid *et al.*, 2000). Únicamente algunas de las moléculas de la saliva son responsables de la inducción de la respuesta DTH y, además, la respuesta producida por esas moléculas se rige por factores genéticos del hospedador (Belkaid *et al.*, 2000; Valenzuela *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2006). En estudios recientes sobre personas en Mali, se ha observado que individuos procedentes de una zona endémica de LC desarrollan diferentes patrones de respuesta celular (Th1, Th2 o respuesta mixta Th1/Th2) frente a la saliva de *P. duboscqi* (Oliveira *et al.*, 2013).

1.9.3. La saliva como marcador de exposición, una herramienta de control

El desarrollo de anticuerpos frente a la saliva de los artrópodos hematófagos es específicamente dependiente de la exposición a estos. La correlación entre los niveles de anticuerpos de tipo IgG anti-saliva y la exposición a los artrópodos se evidenció por primera vez en sueros de campesinos que habían estado en contacto con las picaduras de *Ixodes damini* en New Jersey (Schwartz *et al.*, 1990). Posteriormente, otros estudios serológicos pusieron de manifiesto que la cinética estacional de estos anticuerpos coincide con el periodo de actividad de los artrópodos (Schwartz *et al.*, 1990; Palosuo *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2002). Este aspecto es útil epidemiológicamente, por ejemplo, para medir la efectividad de los programas de control de vectores y diseñar mejores estrategias para el control de la leishmaniasis (Gidwani *et al.*, 2011).

Los primeros ensayos desarrollados para medir anticuerpos anti-saliva se basaron en el empleo de homogeneizados de glándulas salivales (SGH) como fuente de antígeno. La ventaja principal en el uso del antígeno SGH es que representa la batería completa de proteínas salivares. Sin embargo, el empleo de SGH como antígeno tiene algunas limitaciones como son la necesidad de disponer de colonias de flebotomos en laboratorio, lo que conlleva un alto coste (Lestnova *et al.*, 2017), la dificultad en la disección de las glándulas, las reacciones cruzadas entre distintas especies que poseen antígenos salivares comunes y la variabilidad en los antígenos presentes en la saliva según la edad y la dieta de los flebotomos (Volf *et al.*, 2000; Prates *et al.*, 2014). Por todo ello hay un interés creciente en desarrollar pruebas basadas en antígenos recombinantes específicos de especie, y actualmente se encuentran disponibles para las especies *L. longipalpis*, *P. papatasi*, *P. perniciosus* y *P. orientalis* (Teixeira *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2010; Marzouki *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013; Martín-Martín *et al.*, 2014; Drahota *et al.*, 2014; Martín-Martín *et al.*, 2015; Marzouki *et al.*, 2015; Sima *et al.*, 2016; Kostalova *et al.*, 2016).

En sueros de humanos y animales expuestos a las picaduras de *P. papatasi* se han identificado proteínas con pesos moleculares de 42, 34 y 30 KDa (Rohousova *et al.*, 2005;

Vlkova *et al.*, 2011; Marzouki *et al.*, 2011). Entre ellas, las “yellow-related proteins” (YRP) presentes en distintas especies de flebotomos son los antígenos más prometedores para medir la exposición natural en hospedadores por lo que han sido objeto de estudios epidemiológicos (Sima *et al.*, 2016). En un estudio longitudinal en el medio natural, se confirmó que la YRP, rSP03B es una alternativa válida al SGH en el caso de *P. perniciosus* (Kostalova *et al.*, 2015). En este estudio se observó una estrecha relación entre la fenología del vector la densidad de anticuerpos IgG anti-SGH y anti-rSP03B. Los niveles de anticuerpos frente a ambos antígenos fueron más altos durante los meses de verano y disminuyeron durante los meses de invierno, reflejando la estacionalidad de *P. perniciosus* en Italia (Rossi *et al.*, 2008).

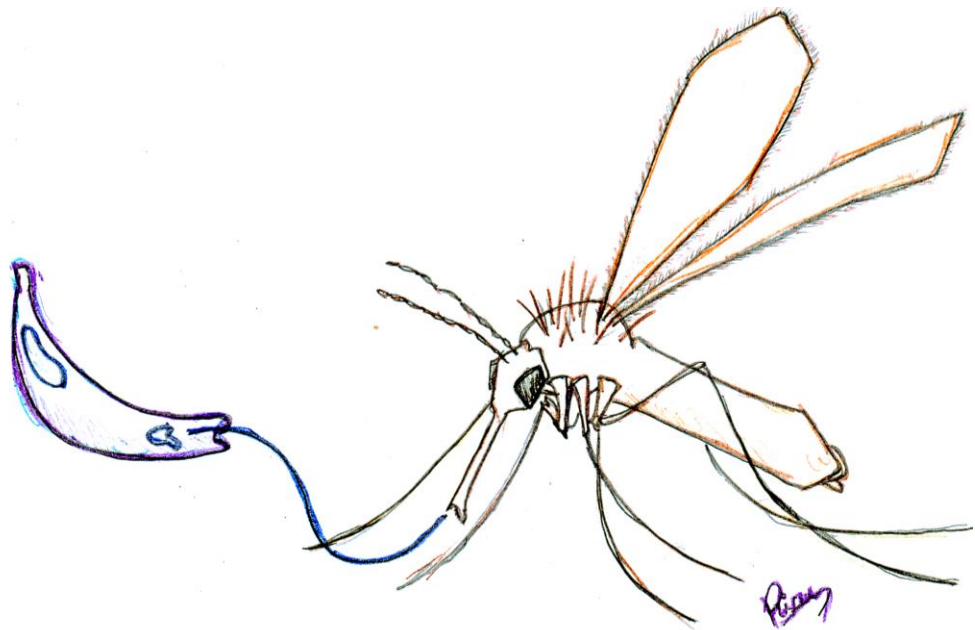
La proteína rSP32 de *P. papatasi* presenta un peso molecular que oscila entre 22 y 35 kDa y un pH muy alcalino. Las secuencias de estas proteínas poseen regiones muy conservadas en los extremos N y C terminal, contrariamente a las zonas internas de la secuencia que se muestran altamente variables (Rohoušová *et al.*, 2012). Se ha observado que esta proteína es el antígeno dominante en la respuesta humoral de humanos en una zona endémica de LC zoonótica de Túnez (Marzouki *et al.*, 2012) y de ratones expuestos experimentalmente a las picaduras de *P. papatasi* (Vlková *et al.*, 2012). La inmunogenicidad de esta proteína posiblemente esté asociada con su elevado nivel de glicosilación (Vlková *et al.*, 2014). La unión de anticuerpos IgG humanos al rSP32 nativo se inhibió mediante la preincubación de muestras de suero con la forma recombinante de rSP32, demostrando similitudes entre las formas recombinantes y nativas de esta proteína (Marzouki *et al.*, 2012). Por otro lado, los sueros obtenidos de personas y perros inmunizados por picaduras de *P. perniciosus*, no reaccionaron con rSP32, confirmando así la ausencia de reacción cruzada entre estas dos especies simpátricas (Marzouki *et al.*, 2012; Marzouki *et al.*, 2015).

Se han descrito 20 proteínas en la saliva de *P. perniciosus*, mediante el análisis de una genoteca de ADNc de las glándulas salivales de especímenes procedentes de una colonia de flebotomos establecida con especímenes capturados en Italia (Anderson 2006).

Estudios en perros expuestos experimentalmente a *P. perniciosus* demostraron una respuesta humoral potente frente a la YRP rSP03B, con un peso molecular de 42 KDa (Vlková *et al.*, 2012). Además de las YRP, otras proteínas salivares de *P. perniciosus* altamente inmunógenas incluyen a las apirasas (rSP01 y rSP01B) que junto a rSP03B, son las mejores candidatas para la evaluación a la exposición experimental en ratones y perros (Drahota *et al.*, 2014). La respuesta de anticuerpos dirigida a estas tres proteínas recombinantes se correlacionó de manera positiva con la respuesta de anticuerpos anti-SGH en estudios experimentales (Drahota *et al.*, 2014) y de perros (Kostalova *et al.*, 2017) y en liebres expuestas de forma natural. Entre ellas, la rSP03B parece ser el mejor marcador de exposición canina porque presenta la menor dispersión de datos (Martín-Martín *et al.*, 2014). En cambio, en ratones, la proteína apirasa rSP01B parece ser mejor marcador de exposición a *P. perniciosus* (Martín-Martín *et al.*, 2015).

Según lo expuesto esta novedosa metodología es una herramienta útil para determinar la exposición a flebotomos y la eficacia de los tratamientos antivectoriales. La disminución de los niveles de anticuerpos anti-saliva en una población tras la incorporación de medidas antivectoriales, implicaría un éxito en los tratamientos. En Angola y Nepal se utilizó la detección de anticuerpos frente a la saliva de *P. argentipes* y *P. papatasi* en el primer caso y de *Anopheles gambiae* en el segundo, para evaluar la eficacia del uso de mosquiteras impregnadas con insecticida en zonas endémicas de leishmaniosis y malaria, respectivamente (Drame *et al.*, 2010; Gidwani *et al.*, 2011). En esta tesis se empleó por primera vez la detección de anticuerpos frente a homogenados de glándulas salivares y proteínas específicas recombinantes de *P. perniciosus* y *P. papatasi* para comprobar la actividad repelente de un insecticida comercial para perros de uso frente a flebotomos y otros ectoparásitos.

OBJETIVOS

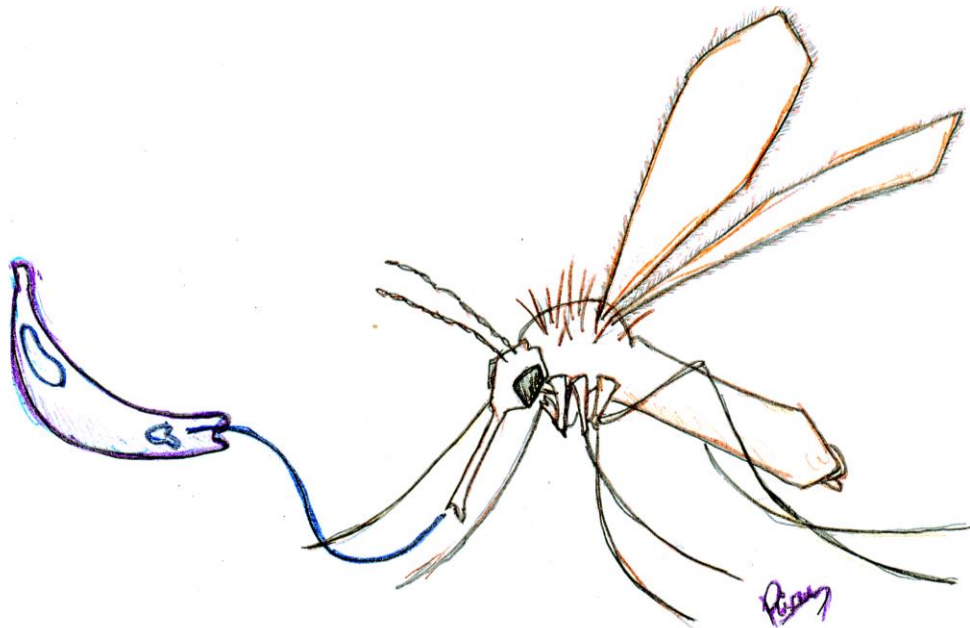


Estudios anteriores confirman que la Región de Murcia es un lugar endémico de *L. infantum* y que la prevalencia de infección en perros y humanos varía según las zonas en función de las características medioambientales. No existe información similar sobre la prevalencia de la infección en fauna silvestre, ni sobre la distribución y abundancia de flebotomos vectores de *L. infantum* en la región. Ambos son aspectos esenciales para evaluar el riesgo de Leishmaniosis y diseñar estrategias de control a medida, basadas en la evidencia científica. Por otro lado, la clave del control de la Leishmaniosis es el uso de insecticidas en el perro, pero su eficacia es escasa en condiciones no experimentales, probablemente porque no se utilizan correctamente. Es necesario comprobar la actividad repelente de los insecticidas anti-flebotomos en condiciones naturales de la Región de Murcia cuando se emplean según prescriben los fabricantes. En este contexto, la propuesta de esta Tesis es abordar estas deficiencias en el conocimiento de la entomología, epidemiología y control de la leishmaniosis en la Región de Murcia. Con este fin, se establecieron los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar la abundancia y distribución de flebotomos en el ámbito rural de las principales zonas geoclimáticas de la Región de Murcia.
2. Estudiar la relación entre la abundancia del principal vector de *L. infantum*, *P. perniciosus* y las características medioambientales.
3. Estimar la prevalencia de infección de *L. infantum* en carnívoros silvestres, mustélidos, lagomorfos y roedores en el sureste de España, principalmente en la Región de Murcia.
4. Analizar la distribución geográfica y temporal de la infección en la fauna silvestre y su relación con las características climáticas de sus zonas de actividad y con la prevalencia de infección en perros y humanos y la abundancia del vector descrita en estudios anteriores.

5. Investigar la eficacia del insecticida para perros Advantix (Bayer®) para prevenir la exposición natural a *P. perniciosus* y *P. papatasi*, mediante la detección de anticuerpos frente a proteínas totales y recombinantes rSP32 y rSP03B.

MATERIALES Y MÉTODOS



1.10. Estudio de la abundancia y distribución de flebotomos en el ámbito rural de la Región de Murcia

1.10.1. Área de estudio: *La Comunidad Autónoma* de la Región de Murcia

La Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM) está situada en el sureste de la Península Ibérica, entre los paralelos 37° 20' y 38° 45' de latitud norte y los meridianos 2° 20' y 0° 42' de longitud oeste. Tiene una extensión de 11.313 km², lo que supone el 2,24 % del total de España, y ocupa el noveno lugar en el conjunto de las comunidades autónomas. Limita al noroeste con Castilla-La Mancha, al este con la Comunidad Valenciana, al suroeste con Andalucía y al sureste con el mar Mediterráneo. La población actual es de 1,465 millones de habitantes (INE, 2016), lo que representa más del 3% del total de población española. La densidad es de 126,05 hab./km², superior a la del conjunto de España (91,22 hab/km²). Sin embargo, la distribución territorial de la población es muy desigual y los núcleos de población están dispuestos en ejes en base al medio natural y la actividad económica. El sector terciario es el principal sector económico de Murcia; ocupa al 61,5 % de la población y supone el 59,1 % del PIB de la Comunidad. La agricultura y ganadería siguen siendo un motor importante de desarrollo en la CARM, este sector ocupa al 9,3 % de la población murciana. La industria se encuentra muy ligada a este sector, encontrándonos con dos ramas principales: alimentación y la minería de metales.

Orográficamente el territorio murciano se extiende por el extremo oriental de los Sistemas Béticos. Las unidades de relieve siguen una orientación suroeste-noreste y entre ellas se distinguen alineaciones montañosas, altiplanos, depresiones interiores y llanuras litorales (Prieto-Cerdán, 2009). El 57% del espacio regional está ocupado por cultivos

agrícolas, desempeñando la actividad agraria un papel fundamental en la forma, gestión e imagen del territorio (Meseguer, 2006).

El **clima** de La CARM está descrito característicamente como mediterráneo con rasgos áridos: veranos cálidos y secos, inviernos suaves, aunque con frecuentes heladas en el interior, y lluvias en primavera y otoño. Las lluvias se presentan de manera escasa y de carácter torrencial en unos pocos días del año, con máximas en otoño. Se distinguen tres variantes en el clima murciano: subhúmedo, semiárido y árido. (García y Sarria, 2006).

La **vegetación** se encuentra muy ligada al clima. Las zonas de alta densidad forestal escasean, encontrándose principalmente en el noroeste y formadas por árboles de hoja perenne, como el pino carrasco, la encina y la sabina albar. La degradación del bosque mediterráneo por factores naturales y humanos ha dado lugar a la aparición de abundantes zonas de matorral y estepa, compuesto por una gran variedad de plantas aromáticas (tomillo, romero y retama), esparto y boja. En los márgenes del curso alto del río Segura se desarrolla el bosque de ribera, formado por álamos blancos, fresnos, sauces y tarayes.

En resumen, la gran variabilidad orográfica, vegetal y climática de Murcia representados por los distintos matices bioclimáticos descritos por Martínez-Ortega (1988) y denominados por el autor como áreas flebotomocenóticas, en estrecha relación con las 5 zonas geoclimáticas distintivas, hacen que este enclave sea idóneo para el estudio de los aspectos relacionados con el vector analizados en esta tesis.

Por las características descritas, la CARM ofrece una disposición **en ejes o zonas geoclimáticas** (Fig. 18). Estas zonas son:

1. La zona **Oeste** con Caravaca de la Cruz como principal núcleo de población, se sitúa en gran parte por encima de los 600 m de altitud. Destacan la altiplanicie de Archivel a casi 1000 m y las áreas montañosas que alcanzan los 2014 m en el

Macizo de Revolcadores. Las medias de temperatura anuales registradas están entre 14 y 16°C y se caracteriza por un periodo frío con temperaturas por debajo de 7°C durante 5-7 meses y temperaturas medias máximas en verano de entre 24 y 28°C. La precipitación media anual se encuentra entre los 400 y 700 mm, existiendo un periodo seco de 4-6 meses.

2. La zona **Norte**, que engloba el llamado Altiplano con Yecla y Jumilla como principales núcleos de población. Su altitud oscila entre 500 m y 1000 m y sus tierras están dedicadas al cultivo de secano. Se diferencia de la Zona Oeste, por presentar mayor termicidad invernal y estival. Las precipitaciones que recibe la comarca oscilan como media, entre 292 y 333 mm. La amplitud térmica rebasa los 18°C para toda la comarca, encontrándonos una media de 26°C durante el periodo más cálido de verano y 6°C de media durante el mes de enero.
3. La zona **Sur** con Lorca y Totana y Alhama de Murcia como principales poblaciones, se extiende en dirección suroeste-noreste por el valle del Guadalentín. Su altitud oscila principalmente entre los 150 y 500 m y el regadío ocupa más de la mitad de las tierras cultivadas. Hay un periodo frío de 3-5 meses con una temperatura media de 1 y 7°C y un periodo cálido de 2-3 meses con una temperatura media de 25 y 27°C y temperaturas máximas medias de entre 33 y 38°C. El periodo seco ocupa la mayor parte del año (6-8 meses) con una precipitación media anual de entre 300 y 400 mm.
4. La zona **Centro** donde se encuentran las áreas más desarrolladas y pobladas de la CARM incluida la ciudad de Murcia. Sus tierras se sitúan a altitudes por debajo de los 400 m en cuencas del Guadalentín y del Segura hasta el mar. La temperatura media del mes más frío está entre 8 y 11°C y las medias máximas alcanzan valores mayores de 29 y 33°C . La precipitación media anual es de 200-300 mm. El periodo seco tiene una duración de 7-11 meses. Ocupan

un segundo lugar en superficie destinada a cultivos de regadío entre los que destacan frutales (limonero) y hortalizas.

5. La zona **Sureste** incluye casi toda la faja costera cuya altitud máxima es de 200 m hasta el mar donde se encuentran las llanuras litorales. No existe un periodo frío, las temperaturas medias del mes más frío están por encima de 13°C y la media de las mínimas de ese mes es de 9°C. La influencia marítima se refleja en los datos de temperaturas: la temperatura media del mes más cálido está entre 26-27°C y la máxima de dicho mes entre 29 y 31°C. La precipitación media anual se sitúa entre 150 y 200 mm; por tanto, los periodos secos tienen una duración entre 11 y 12 meses.

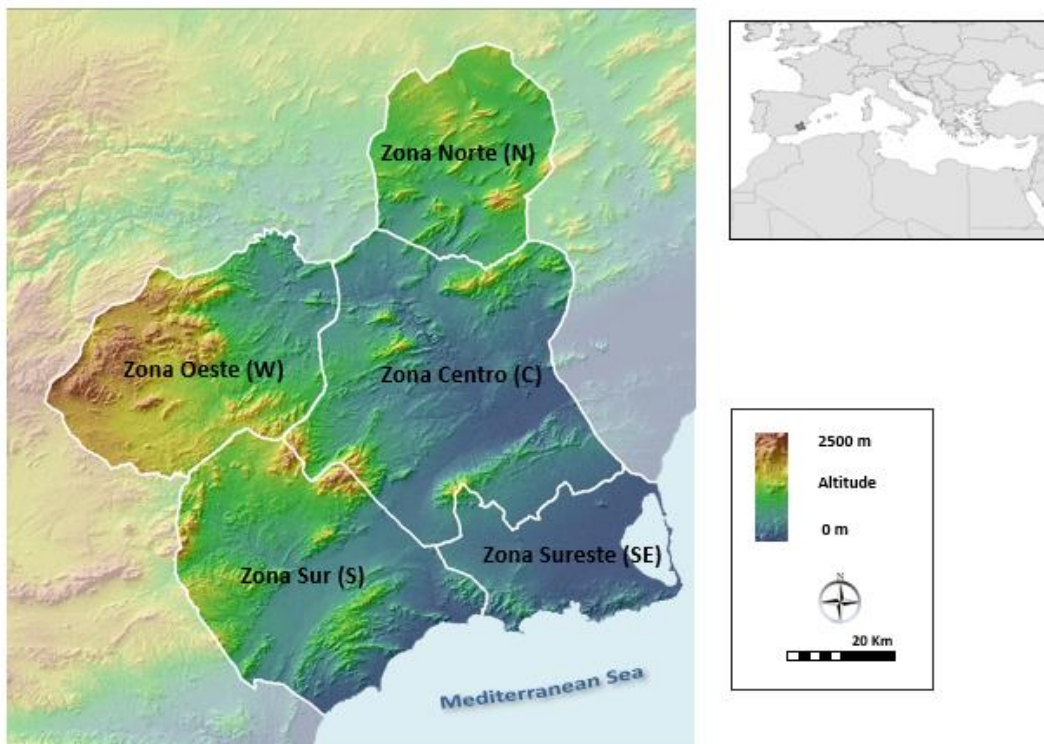


Figura 18. Localización de la CARM y Distribución de las 5 zonas biogeográficas tradicionalmente reconocidas en base a su vegetación, orografía y climatología.

1.10.2. Diseño experimental del estudio

Se llevó un estudio longitudinal de la abundancia de flebotomos en zonas rurales de las cinco zonas geoclimáticas principales de la CARM antes mencionadas incluidas la Norte (N), Sur(S), Centro (C), Oeste (W) y Sureste (SE). En cada zona se colocaron trampas en cinco lugares: 3 granjas de ganadería ovina y 2 perreras con lo que el total de lugares estudiados fueron veinticinco (Fig. 19). Las instalaciones fueron seleccionadas por veterinarios locales en función de la disposición de los propietarios a participar en el estudio de manera desinteresada. En ninguno de los lugares estudiados había un conocimiento previo de la abundancia de flebotomos y la prevalencia de LCan y LHum.

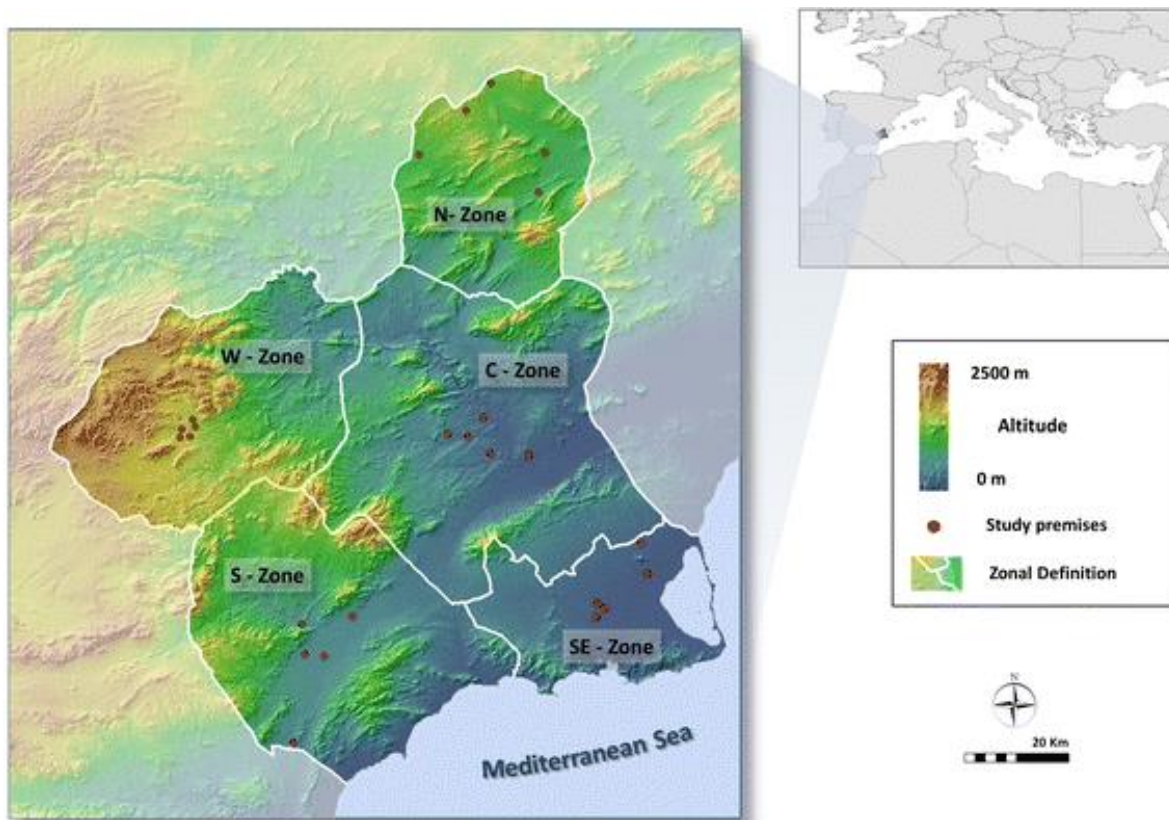


Figura 19. Localización de cada punto de muestreo perteneciente al estudio entomológico

Cada lugar se muestreó en ocho ocasiones durante 24h/ocasión a intervalos de 2 semanas entre el 25 de mayo (4ª semana del mayo) y el 16 de octubre de 2015 (3ª semana de octubre), exceptuando agosto, completándose cada muestreo de los 25

lugares en cinco días, de lunes a viernes. En cada uno de los lugares y ocasión de muestreo se colocaron 1 trampa de luz de tipo CDC y 8 trampas adhesivas consistentes en folios de papel A4 (215 x 315 mm) impregnado en aceite de ricino. De este modo, el **objetivo** fue colocar un número total de **trampas de luz-días de 200** (1 trampa× 25 lugares × 8 días) y de **trampas** adhesivas de 1,600 (1 trampa× 25 lugares × 8 días). Las trampas se colocaron siempre en los mismos lugares. La de luz en el interior del edificio donde se alojaban los animales, próxima a la pared del corral y las trampas adhesivas en el interior y exterior del edificio en lugares que se consideraron representativos de los distintos ambientes de la granja, y próximas a paredes, ventanas y vallas (Fig. 20).



Figura 20. Ejemplos de trampas luminosas (A, B y C) y adhesivas (D, E y F) colocadas durante el estudio entomológico en las distintas zonas de muestreo de la CARM.

Pasadas 24 horas se recogieron las trampas. Las capturas de las trampas de luz se mantuvieron a -20°C durante al menos 1 hora para matar a los flebotomos que se almacenaron en viales con etanol absoluto hasta que se procedió a su identificación. Las

trampas adhesivas se archivaron individualmente entre dos folios de papel A4 en carpetas identificadas con el lugar y fechas de muestreo y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta que se procedió a recoger y los flebotomos adheridos a la trampa con un pincel mojado en etanol al 70%. Seguidamente se almacenaron en viales con etanol absoluto para su posterior identificación.

1.10.3. Montaje e identificación de flebotomos

Los flebotomos de cada vial, correspondientes a una trampa concreta, se pasaron a una placa de Petri y se separaron los machos de las hembras a simple vista o en algunos casos con ayuda de un estereomicroscopio. Para identificar las especies, los machos se montaron en portaobjetos con líquido de Hoyer, manipulándolos con dos agujas entomológicas de 0,20 mm en un estereomicroscopio hasta extender y hacer visibles las estructuras de la genitalia empleadas para la especiación (Fig. 21, A, B). En el caso de las hembras, la identificación de la especie se realizó directamente bajo el microscopio, basándonos en la morfología de la cabeza y teniendo en cuenta la presencia de cibario armado como rasgo distintivo en la especie *S. minuta*. Para el resto de las hembras, pertenecientes al género *Phlebotomus*, se examinó la morfología de las espermatecas (Fig. 21 C, D). Para ello, primeramente, se realizó la disección del abdomen a nivel del VIII segmento con agujas entomológicas y se procedió a su aclarado con líquido de Marc-André bajo el calor de una llama. Para evitar un aclarado excesivo se controló el tiempo que permaneció cada muestra en el líquido de Marc-André que osciló entre 30 y 35 segundos. Durante este tiempo se flameó el portaobjetos por la parte inferior varias veces hasta observar la formación de burbujas indicativas de ebullición del líquido de Marc-André. Posteriormente se retiró el líquido sobrante con un papel de filtro y se procedió a la adición del líquido de Hoyer y cubreobjetos para su observación bajo el microscopio.

La identificación específica, tanto de los machos como de las hembras, se realizó con el microscopio óptico a 4X y 10X aumentos, siguiendo las claves de identificación de

Gállego Berenguer *et al.* (1992), las claves taxonómicas de Lewis (1982), el cuaderno del Dr. Shabaan El-Hossary (2006) y el cuaderno Lawyer *et al.* (2011).

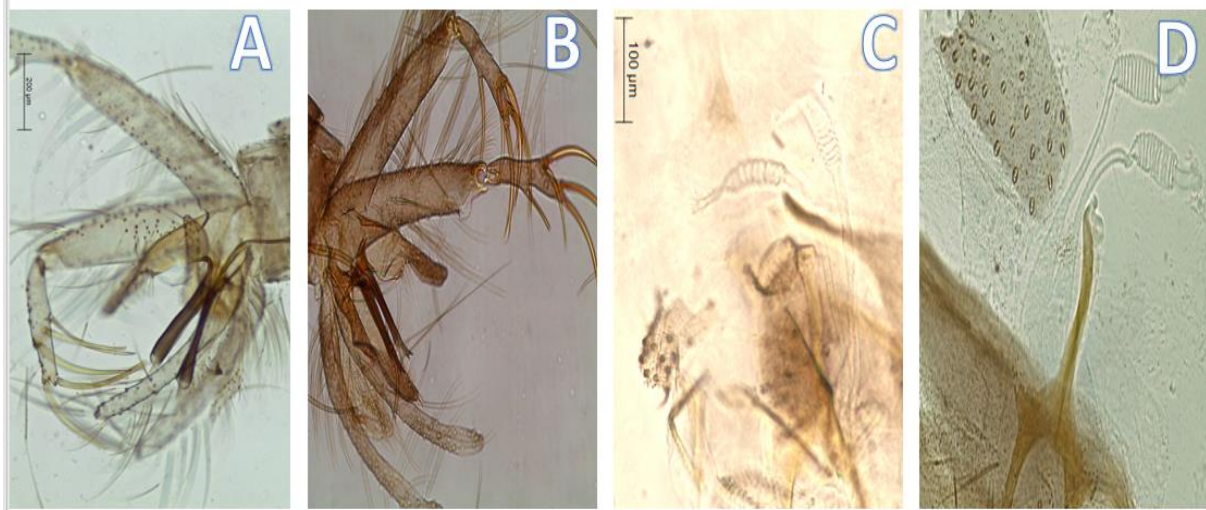


Figura 21. Imagen obtenida por microscopía óptica de las genitales de las especies vectoras de *L. infantum* en la Península Ibérica. A y B) machos de *P. ariasi* y *P. perniciosus* C y D) espermatecas de las hembras *P. perniciosus* y *P. ariasi*.

1.10.4. Datos medioambientales

En cada una de las 25 granjas y perreras del estudio de flebotomos se colocó un termohigrómetro digital (Logtag, Haxo-8 T, Templyzer) a 2-3 m de la trampa de luz, para registrar la temperatura y la humedad relativa (HR) cada 3 h. Además, se registraron las coordenadas geográficas con un sistema de posicionamiento global (GPS) que se emplearon para representar en un mapa los lugares de muestreo y delimitar una zona circular de 500 m de radio alrededor de cada lugar. De esta zona se extrajeron datos medioambientales para analizar su relación con la abundancia de flebotomos, empleando el sistema de información geográfica (SIG) ArcGIS v.10 (ESRI, Redlands, EE. UU.).

Los datos medioambientales de la zona perimetral de las granjas y perreras fueron: (i) información climática obtenida por interpolación (Ustrnul and Czekierda, 2005) de la serie temporal 2006-2015 de 56 estaciones meteorológicas incluidas 47 estaciones de la

Región de Murcia (<http://siam.imida.es>) y 9 estaciones de regiones colindantes (Castilla La Mancha: <http://crea.uclm.es/siar/datmeteo>; Comunidad Valenciana: <http://riegos.ivia.es/red-siar>; Andalucía: <http://www.juntadeandalucia.es>), (ii) datos topográficos y geomorfológicos del modelo de elevación digital (DEM) de la misión TERRA, que usa el sensor Radiómetro de Emisión Térmica y Reflexión de Base Espacial Avanzado (<https://asterweb.jpl.nasa.gov/gdem.asp>), (iii) taxonomía de suelo procedente del proyecto LUCDEME (<http://www.magrama.gob.es>) (escala 1:100000), (iv) datos de clasificación de suelos que se obtuvieron del proyecto Magna (<http://info.igme.es/cartografia/magna50.asp>) (escala 1:100000) y (v) datos de la cobertura de uso del suelo, del programa CORINE Land Cover (escala 1: 100000) (<http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/clc-2006-vector-data-version>).

Los datos climáticos de las estaciones meteorológicas incluyeron promedios diarios para el período de estudio y promedios mensuales para la serie temporal 2006-2015 de las siguientes variables: máxima absoluta, absoluta, media, mínima y mínima absoluta de HR y temperatura, máxima y total de precipitación, y velocidad máxima y media del viento. Con estos datos climáticos se calcularon medias anuales y de los periodos mayo-octubre (periodo de actividad de los flebotomos adultos en Murcia), noviembre-Abril (periodo de nula o baja actividad de flebotomos adultos), que se emplearon junto a otras variables medioambientales como variables explicativas en los modelos de regresión de la abundancia de flebotomos, como se describe en el siguiente apartado.

Además, se entrevistó a los ganaderos y se realizaron medidas en los lugares de estudio para obtener datos sobre las características estructurales de los edificios, el manejo de los animales, la frecuencia de uso de desinfectantes en cada edificio y de tratamientos insecticidas en los animales y la posición de las trampas.

1.10.5. Análisis estadístico de la relación entre la abundancia de flebotomos y el medio ambiente

Se analizaron las distribuciones de flebotomos y de las variables ambientales, así como la asociación entre ambas. En el análisis bivariante se compararon las medianas y proporciones con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la Chi-cuadrado modificada de Yates, respectivamente, y se estudió la correlación entre variables numéricas mediante la prueba del coeficiente de rangos Spearman.

Seguidamente se procedió al desarrollo de modelos multivariados de regresión binomial negativa multinivel para examinar la contribución independiente de los factores ambientales (variables explicativas) a la abundancia de flebotomos (variable dependiente), teniendo en cuenta la correlación entre las medidas de abundancia de los mismos lugares a lo largo del tiempo (Snijders *et al.*, 1999).

Se desarrollaron dos tipos de modelos multinivel según los datos utilizados: (i) los modelos Tipo I en los que se emplearon datos de la temperatura y HR de los termohigrómetros junto a otros datos ambientales del área de alrededor de las instalaciones y las características de las instalaciones, y (ii) los modelo Tipo II que se diferenciaron de los anteriores en que los datos de temperatura y HR también fueron del área de alrededor de las instalaciones. Los modelos tipo II se desarrollaron para identificar variables que podrían usarse para generar un mapa predictivo de la densidad del vector en la CARM y compararlo con mapas de prevalencia de leishmaniosis canina, humana y de fauna silvestre.

Las variables ambientales se incorporaron en los modelos como explicativas fijas categóricas en los de tipo I y como continuas en los de tipo II. Las instalaciones se incorporaron como aleatorias, considerando tanto las diferencias potenciales en la media global (intersección con el eje de abscisas) como a lo largo del tiempo (pendiente) (Snijders *et al.*, 1999). En esencia este abordaje permite considerar variabilidad entre

lugares en la relación entre la abundancia de flebotomos y las variables explicativas y que esta variabilidad sea distinta a lo largo del tiempo.

A la hora de construir los modelos, se utilizó el método “step-wise” (paso a paso) (Kleinbaum *et al.*, 1998), comenzando con un modelo que incluyó solo variables climáticas, y posteriormente, se añadieron otras variables ambientales significativamente asociadas con la abundancia de flebotomos en el análisis bivalente. Estas variables fueron las características de la construcción, el uso del suelo y las de taxonomía y uso del suelo. Debido a la alta correlación entre las variables ambientales (por ejemplo, entre la edad de construcción y el tipo de material de la pared del edificio donde se pusieron las trampas o entre la altitud y la temperatura ambiental), se consideraron varios modelos con distintas combinaciones de variables explicativas significativamente asociadas con la abundancia de flebotomos. Entre ellos, se consideró el más parsimonioso el que tuvo el valor más bajo del Criterio de Información de Akaike (AIC) (Kleinbaum *et al.*, 1998). Finalmente, se exponenciaron los coeficientes de regresión para calcular los “incidence rate ratios” (IRR) definidos como el cociente de la tasa de incidencia (numero de flebotomos en 24 hrs.) asociadas a dos niveles de una variable explicativa.

Se tomó un nivel de significancia del 5% ($P < 0.05$) para un test de dos colas. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa R (<http://cran.rproject.org>).

1.11. Estudio de la prevalencia de *L. infantum* en fauna silvestre en el sureste de España

1.11.1. Población de estudio

Se investigó la prevalencia de *L. infantum* mediante PCR en muestras de tejido de 202 carnívoros, roedores y lagomorfos silvestres del sureste de España. Con excepción de los lobos que pertenecían al zoológico Terra Natura, los demás animales habían sido

cazados por cazadores autorizados o encontrados muertos por accidente de tráfico por personal municipal. Los animales se recogieron para una investigación más amplia de las enfermedades parasitarias y se llevaron al departamento de enfermedades parasitarias de la Universidad de Murcia (UMU) donde se registró su edad (juvenil o adulto), sexo y peso y condición corporal (baja u óptima), se realizó una necropsia y se tomaron muestras para diagnóstico de *L. infantum* de piel (n=168), bazo (n=190), hígado (69) y linfonodos (n=4). Las muestras, que se almacenaron a -20°C hasta que se procedió al diagnóstico, procedían de 80 conejos (*Oryctolagus cuniculus*), 69 zorros (*Vulpes vulpes*), 16 ratones de campo (*Apodemus sylvaticus*), 10 garduñas (*Martes foina*), 10 ratas negras (*Rattus rattus*), 6 tejones (*Meles meles*), 4 gatos monteses (*Felis silvestris*), 3 lobos ibéricos (*Canis lupus signatus*), 2 mapaches (*Procyon lotor*) y 1 liebre ibérica (*Lepus granatensis*), de los cuales 188 fueron de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM), 12 de la Comunidad Valenciana (CV) y 2 de Andalucía (A).

1.11.2. Purificación de ácidos nucleicos de las muestras de fauna silvestre y estimación de la cantidad y calidad obtenida

Se utilizó el robot Maxwell[®]16 System (Promega, Southampton, UK), empleado el kit Maxwell[®]16 FFPE Tissue SEV DNA Purification Kit (AS1030), para purificar ácidos nucleicos de las muestras de los animales silvestres. Se emplearon 50 mg de cada muestra y las de piel se sometieron a una digestión previa en 400 µl de una solución de lisis de TE (Tris 10mM + EDTA 1mM a pH= 8.00) con proteinasa K (10 µg/µl) y dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, a 56°C toda la noche. Seguidamente se analizó la concentración y pureza de las muestras de ácidos nucleicos con un espectrofotómetro NanoDrop[™] (Thermo Scientific[™]) obteniéndose como medida de pureza la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm y considerando como adecuadas para el análisis de PCR las de A260 / 280 > 1,7.

1.11.3. Detección de secuencias de *L. infantum* en fauna silvestre mediante PCR a tiempo real

Se analizaron las muestras de ADN con una PCR a tiempo real (rtPCR) para amplificar una secuencia de ADN de 140 bp, empleando los cebadores LeiM1 (forward): 5'-CTT TTC TGG TCC TCC GGG TAG G-3' y LeiM2 (reverse): 5'-CCA CCC GGC CCT ATT TTA CAC CAA-3' y una sonda TaqMan® LeiM3: TTTTCGCAGAACGCCCTACCCGC marcada con 6-FAM y empleando el *quencher* TAMRA, según describe Mary *et al.*, (2004). Para la PCR se emplearon placas de 96 pocillos (Fast®) y las muestras se hicieron por duplicado en un volumen de 20µl con concentraciones de 250ng de muestra de ADN, 0,75µg de cebadores y 0,25µg de sonda en una solución IQ™ Supermix de Bio-Rad, con la enzima Taq polimera y los dNTPs. Los volúmenes empleados de reactivos en cada pocillo fueron los siguientes:

1. Master mix (2x): 10 µl
2. LeiM1-forward (10 µM): 1,5 µl
3. LeiM2-reverse (10 µM): 1,5 µl
4. LeiM3- sonda TaqMan® (5 µM): 1 µl
5. ADN (50ng/ml): 6 µl

La reacción se llevó a cabo en el termociclador *7500 Fast Real Time PCR System* de Applied Biosystems® con una primera fase de preparación a 50°C durante 30 segundos seguida de una fase de desnaturalización del ADN a 95°C durante 10 minutos y a continuación 45 ciclos con dos estadios cada uno incluidos, uno de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos y otro de hibridación y extensión a 55°C 1 minuto. Como control negativo de PCR se empleó agua milli-Q estéril y como controles positivos de extracción de ADN y de PCR se emplearon muestras de perros positivos anteriormente analizadas.

Tras realizar la rtPCR se procedió a la lectura e interpretación de las curvas de amplificación mediante el Software *7500 v 2.0.6*, determinándose el ciclo de amplificación umbral (Ct), aquel en el que comienza la fase lineal de la curva logarítmica de

amplificación, con el fin de obtener una medida semicuantitativa de la carga parasitaria (Maia y Campino *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2008). Los ciclos tempranos son indicativos de cargas parasitarias más elevadas que los ciclos de amplificación tardíos y en este trabajo se consideraron como positivos a las muestras con $Ct \leq 38$ ya que el número de copias de ADN diana para este valor se aproximan a la unidad (Chamizo *et al.*, 2005; Mackay, 2007).

1.11.4. Datos medioambientales y análisis estadístico de la relación entre la infección por *L. infantum* y variables de los animales y el medio ambiente

Se recogieron datos medioambientales de los lugares presumibles de actividad de los zorros y conejos que fueron las especies más abundantes y con una distribución espacial más heterogénea. Para ello se procedió de forma similar a la descrita para caracterizar la zona perimetral (500 m de radio) de los lugares del estudio de flebotomos (apartado 5.1.1.), salvo que en este caso se consideraron zonas de actividad de los animales de un tamaño de 7 km² para los zorros y de 0,8 km² para los conejos (Sanz, 2017). De estas áreas se extrajeron datos de temperatura media, humedad relativa media, precipitación total y velocidad de viento máxima, exclusivamente.

En el análisis estadístico se calculó el porcentaje de muestras y animales rtPCR positivos (prevalencia) y la distribución de Cts en muestras positivas para el conjunto de los animales y según la especie, el sexo, la edad, la condición corporal, el año y la zona geográfica de origen para las especies más comunes incluidas los zorros, conejos, garduñas y ratones de campo. Como se ha explicado anteriormente, la CARM, de donde procedían la mayoría de los animales, se dividió en las cinco principales zonas geográficas (norte, sur, centro, oeste y sureste) y las proporciones se compararon con la prueba de chi-cuadrado de Yates o el test de Fisher, y las medianas de Ct con la prueba de Kruskal-Wallis.

Se desarrollaron modelos de regresión logística para investigar la relación multivariable entre positividad para PCR (variable dependiente binaria) en todos los

animales y en zorros o conejos y las variables explicativas zona geográfica, estación del año, edad y sexo, incorporadas como variables categóricas. Se utilizó un enfoque de modelado paso a paso y en el modelo final se mantuvieron solamente las variables asociadas significativamente con el resultado en el modelo final. El ajuste del modelo fue con el método de máxima verosimilitud y se tomó como nivel de significancia el 5% ($p < 0,05$) para una prueba doble. Todos los análisis se realizaron usando R (<https://www.r-project.org/>).

1.12. Estudio longitudinal de anticuerpos frente a la saliva de los flebotomos en perros tratados con insecticida

1.12.1. Diseño y población del estudio

Se llevó a cabo un estudio longitudinal entre abril de 2014 y abril de 2016, en una cohorte de 32 perros experimentales de la raza Beagle que participaban simultáneamente en una prueba vacunal de *L. infantum* en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

Los perros provenían de un criadero comercial de Barcelona (Isoquimen SL) donde se habían mantenido en instalaciones cubiertas a prueba de flebotomos, y llegaron a Murcia tres ocasiones diferentes y por lo tanto estuvieron expuestos a los flebotomos durante un tiempo distinto. De este modo y de cara al análisis los perros se organizaron en los siguientes tres grupos:

- I. Grupo APR14: 22 perros que llegaron en abril de 2014, con una edad media (rango) de 9 (8-63) meses.
- II. Grupo JUN14: 3 perros que llegaron en junio de 2014 con 7 meses de edad.
- III. Grupo MAR15: 8 perros que llegaron en marzo de 2015 con 6 (5-7) meses de edad.

En Murcia los animales se mantuvieron en perreras semicubiertas (5 m²/perro) expuestos de forma natural a los flebotomos de la zona. Desde su llegada a Murcia y cada tres semanas hasta el final del experimento vacunal en septiembre de 2016, los perros recibieron el tratamiento insecticida tópico “Advantix” (permetrina 500 mg/ml e imidacloprid 100 mg/ml; Bayer®), administrado por un veterinario con amplia experiencia en este tipo de tratamiento. Los animales tuvieron acceso ilimitado a una dieta comercial a base de pollo (Libra-Adult, Affinity Pet Care®), se vacunaron contra la rabia, moquillo, adenovirus 2, parvovirus, *Leptospira interrogans* (Eurican MHPPi2, Merial®) y *Bordetella bronchiseptica* y virus Parainfluenza (Eurican Bb/PI2, Merial®) y recibieron un antihelmíntico de amplio espectro para prevenir infecciones por nematodos y cestodos (Prazitel, Ecuphar®) a intervalos de tres meses.

Se recogieron muestras de sangre de la vena yugular para la obtención de suero en 16 ocasiones a lo largo del estudio. Si bien por cuestiones éticas no se incluyó un grupo de perros control no tratado con insecticidas, los perros tratados fueron sus propios controles de no-exposición a flebotomos durante las épocas de ausencia de éstos (invierno fundamentalmente) ya que como se ha explicado la vida media de los anticuerpos frente a la saliva es corta. Este tipo de diseño experimental se conoce en inglés como “crossover design” (Jones y Kenward, 2014).

1.12.2. Diagnóstico de *L. infantum* y estado de infección de los animales

Se evaluó el estado de infección de *L. infantum* de los perros a su llegada a Murcia y nuevamente en abril de 2015, antes de que se infectaran experimentalmente con el parásito para el ensayo de la vacuna. El diagnóstico se realizó con la prueba rtPCR antes descrita (Mary *et al.*, 2004) en muestras de médula ósea, que se considera la prueba más sensible y específica para detectar la infección por *Leishmania* en perros (Baneth *et al.*, 2008). Todos los perros fueron negativos a la rtPCR en ambas ocasiones. Además, los perros también habían sido seronegativos a la técnica de inmunofluorescencia indirecta

(IFAT) de detección de anticuerpos frente a *L. infantum*, realizada por el criador antes de enviarlos a Murcia. Dado que los perros fueron inmunizados con los antígenos vacunales frente a *L. infantum* en junio y julio de 2015, a partir de entonces ya no se pudieron hacer más pruebas para evaluar la infección natural por *L. infantum*. El protocolo de vacunación específico utilizado no puede divulgarse por razones de confidencialidad. Señalar, que incluyó seis grupos de tratamiento en base a la inoculación de uno o dos antígenos con o sin un adyuvante y un estimulador inmunológico.

1.12.3. Abundancia y especies de flebotomos en el lugar del estudio

El lugar en el que se mantuvieron los perros del estudio fue uno de los 25 sitios investigados del estudio anteriormente descrito de la distribución de flebotomos en la Región de Murcia. A modo resumen se colocaron 1 trampa de luz y 0.5 m² de trampas adhesivas en 8 ocasiones (24 horas/ocasión) entre mayo y octubre de 2015, y como se describe en más adelante, en este lugar se capturaron 42 especímenes (36% hembras) incluyendo 55% de *P. papatasi*, 26% de *P. perniciosus* y 19% de *Sergentomyia minuta*, obteniéndose picos de abundancia durante junio y septiembre.

1.12.4. Obtención de antígenos salivares de flebotomos

Se elaboraron pruebas indirectas de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Voller *et al.*, 1978) para detectar anticuerpos en los perros frente a la saliva de *P. papatasi* y *P. perniciosus*, las dos especies más abundantes en el lugar de estudio. De cada especie se utilizó como antígeno tanto homogeneizado de glándula salivar (SGH) como proteínas recombinantes específicas de especie. El SGH se preparó a partir de glándulas salivales enteras de hembras adultas de 4-6 días de edad procedentes de las colonias de laboratorio del departamento de parasitología de la Universidad Charles de Praga.

Para separar las glándulas salivares se colocaron los flebotomos individualmente sobre una gota de una solución tampón de Tris-NaCl en un portaobjetos bajo una lupa a 2x o 4x aumentos. Sujetando el insecto por tórax con unas pinzas manuales de punta dura se diseccionaron las glándulas con agujas entomológicas extrafinas de 0.15 mm con un pequeño garfio en el borde final para poder extraer las glándulas con mayor facilidad (Volf *et al.*, 2000). Para ello es necesario seccionar ligeramente la cabeza del insecto ya que al estirar de ella se arrastran y separan las glándulas (fig. 22). Las glándulas se combinaron en grupos de 20 en un tupo eppendorf con 20 μ l de solución tampón Tris-NaCl (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y se sometieron a tres ciclos consecutivos de congelación-descongelación para fragmentarlas y obtener el SGH, que se almacenó a -20 °C hasta que se empleó para tamizar las placas de ELISA (Kostalova *et al.*, 2015).

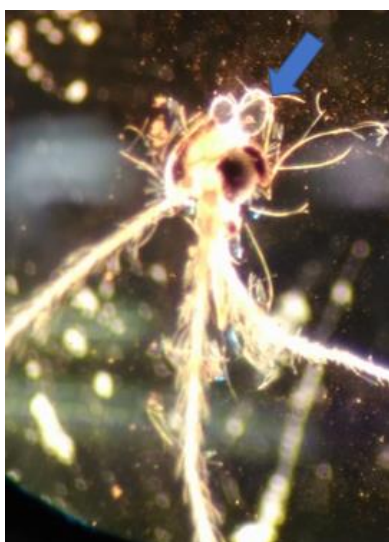


Figura 22. Detalle de la cabeza de *P. perniciosus* con la flecha apuntando a las glándulas salivares observadas bajo el estereomicroscopio (20x)

Las dos proteínas recombinantes específicas (rSP) empleadas fueron la YRP de *P. perniciosus* rSP03B (Genbank ac. C. DQ150622) y la PpSP32 de *P. papatasi* (Genbank ac. JX411944), fabricadas por la empresa Apronex s.r.o. (Praga, República Checa) siguiendo el protocolo descrito por Drahotka *et al.* (2014). Las concentraciones de estas proteínas se cuantificaron mediante el método Lowry (Bio-Rad®) siguiendo el protocolo del fabricante.

1.12.5. *Western blot* para la detección de proteínas inmunogénicas específicas

Para comprobar la inmunogenicidad de las proteínas presentes en el SGH y en los preparados de rSP32 y rSP03B de *P. perniciosus* y *P. papatasi* se empleó la técnica de Western Blot SDS-PAGE (Kim, 2017), utilizando sueros de perros positivos al ELISA. La cantidad de proteína empleada por columna fue 4 µg y 2 µg de SGH y rSP, respectivamente. Tras la separación electroforética de las proteínas en el gel de poliacrilamida y tampón con SDS en un aparato Mini-Protean III (Bio-Rad®), se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa, mediante el sistema de transferencia seco iBLOT (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EE. UU).

Una vez en el soporte sólido se cortaron las láminas en tiras, cada una con el espectro migratorio de un SGH o una rSP y se bloquearon los espacios libres de proteínas con una solución Tris-NaCl-Tween 20 con 5% de leche baja en grasa (Bio-Rad®) incubándolas a 4°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se incubaron las tiras con los sueros de perro individualmente (diluidos 1:25) y en combinación de tres sueros (diluidos 1:50 cada uno) con el fin de obtener una señal más intensa, durante 1 hr. a temperatura ambiente. Tras realizar otra serie de lavados, se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, diluidos en TBS-Tw (anti IgG de perro Bethyl Laboratories® diluido 1:3000) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se visualizaron las proteínas inmunogénicas mediante la adición de la solución de sustrato que contenía 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y H₂O₂ y una vez visibles, se adicionó agua destilada con el fin de detener la reacción.

Los sueros elegidos para realizar el WB fueron cinco del grupo APR14 del segundo año del estudio que se sospechó tendrían una elevada concentración de anticuerpos contra SHG y rSP de *P. papatasi* y *P. perniciosus*. Por otra parte, se empleó como control negativo una muestra de suero canino perteneciente a una localidad no endémica de Leishmaniosis y analizado previamente en el estudio de Kostalova *et al.* (2015) y cuatro

muestras de perros del grupo APR14 tomadas al comienzo del estudio antes de la exposición a los flebotomos.

1.12.6. ELISA para determinar los niveles de anticuerpos

Los anticuerpos específicos IgG anti-saliva y anti-rSP se midieron por duplicado con la técnica ELISA descrita por Kostalova *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Se comenzó tamizando las placas de microtitulación de 96 pocillos con los antígenos a razón de 40ng de SGH (equivalente a 0,2 glándulas) o 5 µg/ml de rSP03B o 4 µg/ml de rSP32 (4 µg/ml) por pocillo disueltas en 1000 µl de una solución tampón de carbonato-bicarbonato 20 mM (pH 9,5) y seguidamente se incubó la placa a 4°C durante la noche. Tras este paso se realizaron 2 lavados consecutivos de la placa con PBS-Tween al 0.05% añadiendo 100 µl/pocillo. Seguidamente se añadió en cada pocillo 100 µl de una solución de bloqueo, consistente en un tampón PBS-Tw con un 6% de leche en polvo baja en grasa, que se incubó a 37°C durante 60 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados de la placa como se ha descrito anteriormente. En el paso siguiente se añadió 100 µl de las muestras suero de los perros diluidas 1:200 (para el SGH) o 1:100 (para las rSP) en PBS-Tw con un 2% de leche en polvo baja en grasa y se incubaron las placas a 37°C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo se realizaron 5 lavados y seguidamente se añadió una dilución 1:9000 del conjugado anti-IgG de perro (Bethyl Laboratories®, Montgomery, EE.UU.) en PBS-Tw y se incubaron las placas a 37°C durante 45 minutos. Pasado este tiempo se añadieron 100 µl/pocillo de una solución de sustrato compuesta por 5mg de o-fenilendiamina (OPD) y 10 µl peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en 10 ml de buffer citrato-fosfato a temperatura ambiente. Tras añadir el sustrato se mantuvieron las placas en oscuridad a temperatura ambiente entre 4-5 minutos. Finalmente se añadió ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 10% para detener la reacción e inmediatamente se procedió a la lectura de la absorbancia en los pocillos a 492 nm usando un lector de microplacas Tecan Infinite® M200 (Suiza).

1.12.7. Análisis de la distribución de anticuerpos ELISA

Se estandarizaron las densidades ópticas de los anticuerpos ELISA usando la siguiente fórmula (Sánchez *et al.*, 2002):

$$SOD = \frac{OD_S - OD_{NC}}{OD_{PC} - OD_{NC}}$$

Dónde: OD: densidad óptica, S = muestra, NC = control negativo, PC = control positivo

El PC para *P. perniciosus* y NC para ambas especies de flebotomos se tomaron del estudio realizado por Kostalova *et al.* (2015). El suero PC para *P. papatasi* se seleccionó de los perros de este estudio con SODs más altas en un estudio preliminar en 40 perros durante el segundo año. Las SOD negativas se aproximaron a cero y se normalizaron usando la transformación logarítmica decimal de SOD+1 y se multiplicaron por 100 (LOD), y se calculó la media de LOD para cada muestra. Dado que hasta la fecha no se han propuesto valores de LOD en suero de perros para diferenciar seropositivos y seronegativos, los puntos de corte elegidos fueron un decimal superior al LOD más alto entre todos los perros cuando se tomaron muestras por primera vez, el día en que se incorporaron al estudio, antes de que se expusiesen a los flebotomos.

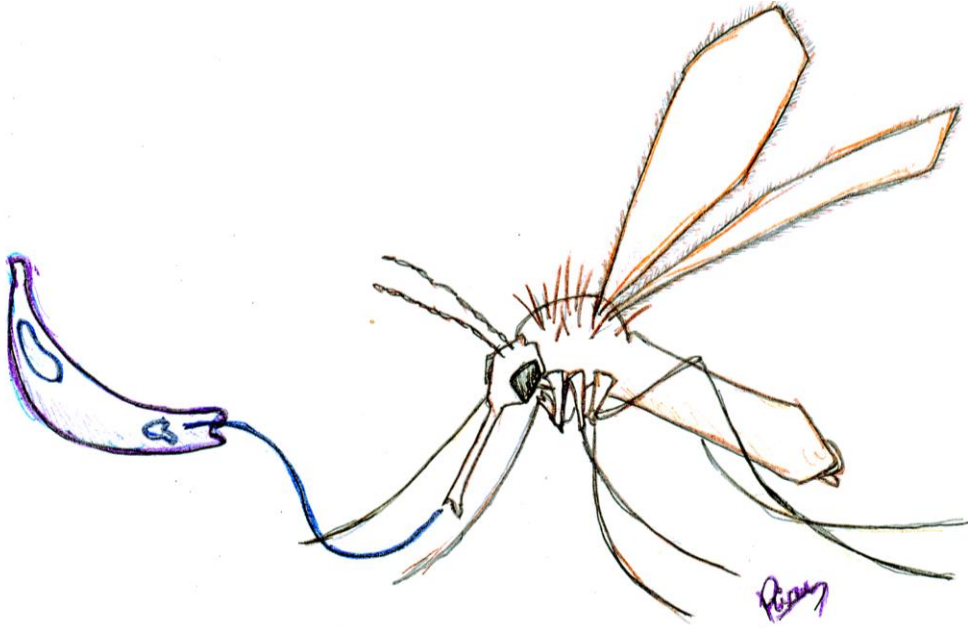
Se estudió la distribución de LODs y la proporción de perros seropositivos a lo largo del tiempo y se compararon medianas y proporciones entre distintos niveles de las variables explicativas (tiempo, sexo, edad, grupo de tratamiento y antígeno) con las pruebas de Wilcoxon y de chi cuadrado de McNemar, respectivamente y se empleó la prueba de Spearman para examinar la correlación entre las LODs de los distintos antígenos (Kirkwood y Sterne, 2010).

Seguidamente se elaboró un modelo de regresión lineal multinivel para examinar la relación entre las LODs de los perros APR14 y el tiempo de muestreo, ajustando el modelo

al antígeno, la edad y el sexo del perro (Kleinbaum, 1998), y teniendo en cuenta la correlación en los LODs resultante de mediciones repetidas de los mismos perros a lo largo del tiempo (modelo jerárquico de 2 niveles con las medidas repetidas como nivel 1 y los perros como el nivel 2 (Bliese, 2013).

La LOD fue la variable dependiente y el antígeno, el tiempo de muestreo, la edad y el sexo se incluyeron como variables explicativas categóricas fijas. El componente aleatorio incluyó el perro y el tiempo, permitiendo así analizar la variabilidad entre perros a lo largo del tiempo. Las estructuras de error consideradas para las unidades de nivel 1 fueron la autorregresiva con respecto al tiempo anterior (autocorrelación), la simétrica (varianza única) y la no estructurada (Bliese, 2013; UCLA: Statistical Consulting Group. Seminarios de cálculo estadístico Análisis de medidas repetidas con R. <https://stats.idre.ucla.edu/r/seminars/repeated-measures-analysis-with-r/>, consultado en noviembre de 2017) y se seleccionaron las estructuras de error con el valor de AIC más bajo. Los modelos se estimaron utilizando el método de estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) y se usaron pruebas t condicionales y F para evaluar la significancia de las variables fijas. Se tomó como nivel de significación alfa = 5% ($p < 0.05$) para una prueba de doble cola. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa R (<http://cran.r-project.org/>).

RESULTADOS



1.13. Estudio de la abundancia y distribución de flebotomos en el ámbito rural de la Región de Murcia

1.13.1. Abundancia y distribución geográfica de flebotomos según el tipo de trampas

Se capturaron 3,644 flebotomos de los cuales 3,109 (85%) con trampas de luz CDC y 535 (15%) con trampas adhesivas. El porcentaje de trampas CDC y adhesivas con al menos un flebotomo (trampas positivas) fue 65% (124/192) y 46% (91/198), respectivamente. La mediana (rango) del número de flebotomos fue de 9 (1-232) en las trampas CDC (Tabla 1) y 6 (2-83) flebotomos/m² en las adhesivas.

La distribución de flebotomos según las zonas geográficas fue similar en ambos tipos de trampa. El porcentaje de trampas CDC positivas fue de un 82% (31/38), 81% (29/37), 72%(28/39), 50%(20/40) y 39% (15/39) en las zonas S, W, C, N y SE, respectivamente (Tabla 1). En las trampas adhesivas la abundancia fue máxima en la zona W y mínima en la SE, mientras que el porcentaje de trampas adhesivas positivas fue máximo en la S y mínimo en la SE. Además de las diferencias entre zonas, la abundancia de flebotomos también varió significativamente entre distintas instalaciones de la misma zona geográfica, encontrando particularmente en las trampas CDC de las zonas S y N (Tabla 1).

La abundancia de flebotomos se asoció positivamente a la altitud, excepto que fue menor en el rango de altitud 536-705 m cuya abundancia total fue 198 flebotomos en comparación con la zona S situada a 282-352 m donde se capturaron 1159 flebotomos ($P < 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de trampas de CDC con flebotomos (trampas positivas) y abundancia de flebotomos en trampas positivas en perreras y establos de ovejas en la CARM durante 2015. * Altitud sobre el nivel del mar (s. n. m.)

Zona	localización	Altitud s. n. m.* (m)	N	% trampas +vas	Abundancia							P valor
					total	media	min	25%	mediana	75%	max	
Central (C)	perrera 1	87	8	75	22	4	1	1	3	5	9	0.1081
	perrera 2	207	8	75	33	6	3	4	5	7	9	
	establo 1	115	7	86	46	8	1	7	9	11	11	
	establo 2	145	8	50	14	4	2	2	2	4	8	
	establo 3	125	8	75	16	3	1	1	2	4	6	
	total		39	72	131	5	1	2	4	8	11	
Norte(N)	perrera 1	629	8	50	14	4	2	3	3	4	6	0.0083
	perrera 2	536	8	25	2	1	1	1	1	1	1	
	establo 1	660	8	75	156	26	10	13	17	23	76	
	establo 2	705	8	75	40	7	2	4	5	5	20	
	establo 3	794	8	25	5	3	2	2	3	3	3	
	total		40	50	211	11	1	3	5	13	76	
Sur (S)	perrera 1	352	8	100	399	50	10	19	56	70	92	0.0042
	perrera 2	265	8	38	7	2	1	2	2	3	4	
	establo 1	291	7	100	561	80	4	21	44	123	225	
	establo 2	322	7	100	132	19	2	7	11	32	41	
	establo 3	286	8	75	60	10	8	9	10	10	13	
	total		38	82	1159	37	1	10	13	46	225	

Tabla 1. Continuación

Zona	localización	Altitud s. n. m.* (m)	N	% trampas +vas	Abundancia							P valor
					total	media	min	25%	mediana	75%	max	
Sureste (SE)	perrera 1	55	7	43	5	2	1	2	2	2	2	0.1390
	perrera 2	83	8	38	3	1	1	1	1	1	1	
	establo 1	25	7	86	17	3	1	2	3	4	5	
	establo 2	53	8	25	3	2	1	1	2	2	2	
	establo 3	44	8	13	1	1	1	1	1	1	1	
	total			38	39	29	2	1	1	2	2	
Oeste (W)	perrera 1	882	8	75	303	51	13	26	36	42	151	0.2701
	perrera 2	889	7	86	189	32	1	11	18	50	84	
	establo 1	875	8	88	619	88	11	33	55	128	232	
	establo 2	882	7	71	247	49	3	13	19	51	161	
	establo 3	844	7	86	215	36	3	9	10	27	151	
	total			37	81	1573	54	1	12	28	58	
total			192	65	3109	25	1	3	9	22	232	<0.0001

1.13.2. Frecuencia de especies y géneros de flebotomos según las zonas y tipo de trampas

La distribución por especies de los 3.586 (98%) flebotomos identificados se muestra en la Tabla 2. *P. perniciosus* representó el 80% de todos los flebotomos capturados, seguido por *P. papatasi* (10%), *P. sergenti* (5%), *S. minuta* (4%) y *P. chabaudi* (<1%), *P. longicuspis* (<1%), *P. ariasi* (<1%) y *P. alexandri* (<1%) (Tabla 2). La distribución de especies varió según el tipo de trampa, la zona y el tipo de instalación. Por ejemplo, la especie predominante *P. perniciosus* fue relativamente más abundante en trampas CDC (84%) que en las adhesivas (55%), en instalaciones con ovejas (84%) que en las de perros (71%) y menos abundante en la zona C (55%) en comparación con otras zonas (Tabla 2). En cambio, la abundancia relativa de *P. papatasi* fue mayor en las trampas adhesivas (27%) respecto a las CDC (7%) y en las zonas C (36%) y N (19%), *P. sergenti* en las trampas adhesivas (12%), en las instalaciones caninas (9%) y en la zona W (8%), y *S. minuta* en las instalaciones caninas (9%) y en la zona C (8%) (Tabla 2).

La proporción de sexos fue similar en todas las especies (Tabla 2). Sin embargo, en las trampas CDC, las hembras de *P. papatasi*, *P. sergenti* y *P. longicuspis* fueron marcadamente más abundantes que los machos, mientras que, en las trampas adhesivas, el 76% de todos los flebotomos eran machos.

1.13.3. Distribución estacional de *P. perniciosus* en trampas de los CDC y relación bivalente con la temperatura y humedad relativa en el interior de las dependencias

Dado que la mayoría de *P. perniciosus* se capturó con las trampas de luz CDC, el estudio de la estacionalidad y relación entre su abundancia y las variables medioambientales se centró en los especímenes capturados con este tipo de trampa.

No se observaron diferencias en la distribución espacial y temporal de *P. perniciosus* machos y hembras ($P > 0,05$), y la Fig. 23 muestra la abundancia estacional de ambos sexos en las trampas CDC, junto con la temperatura media y la HR del día en que se

recolectaron los flebotomos registrada con los termohigrómetros (tabla 3). La abundancia de ésta y otras especies frecuentes fue mayor en julio y alcanzó su punto máximo en todas las zonas durante la segunda semana de este mes. Por otro lado, se recogieron pocos flebotomos en mayo (semana 1) y octubre (semanas 7 y 8) (Figura 23, Tabla 2).

Tabla 2 . Abundancia absoluta y relativa de especies de flebotomos en base a el tipo de trampa, la zona, el sexo, las instalaciones animales y la semana de estudio en la Región de Murcia, sureste de España, en 2015

Variable	Niveles	Especies de flebotomos								
		<i>P. perniciosus</i>	<i>P. papatasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. chabaudi</i>	<i>P. longicuspis</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. alexandri</i>	All
Trampa	CDC	2563 (84)	219 (7)	108 (4)	121 (4)	17 (1)	17 (1)	14 (1)	1 (<1)	3060 (100)
	Adhesivas	290 (55)	141 (27)	61 (12)	24 (5)	6 (1)	3 (1)	1 (<1)	0 (0)	526 (100)
Zona	W	1439 (82)	84 (5)	136 (8)	61 (3)	22 (1)	9 (1)	7 (<1)	1 (<1)	1759 (100)
	SE	27 (87)	2 (2)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	31 (100)
	S	1041 (80)	146 (11)	29 (2)	62 (5)	1 (<1)	8 (1)	7 (1)	0 (0)	1296 (100)
	C	102 (55)	66 (36)	0 (0)	14 (8)	0 (0)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	184 (100)
	N	244 (77)	62 (19)	4 (1)	7 (2)	0 (0)	1 (<1)	0 (0)	0 (0)	318 (100)
Sexo	hembras	1310 (79)	191 (12)	70 (4)	62 (4)	0 (0)	16 (1)	8 (1)	1 (<1)	1658 (100)
	machos	1543 (80)	169 (9)	99 (5)	83 (4)	23 (1)	4 (<1)	7 (<1)	0 (0)	1930 (100)
localizacion	perreras	824 (71)	91 (8)	108 (9)	103 (9)	20 (2)	8 (1)	13 (1)	1 (<1)	1168 (100)
	Establos	2029 (84)	269 (11)	61 (3)	42 (2)	3 (<1)	12 (1)	2 (<1)	0 (0)	2420 (100)
Semana	1	152 (78)	25 (13)	6 (3)	4 (2)	0 (0)	6 (3)	3 (2)	0 (0)	196 (100)
	2	491 (87)	58 (10)	6 (1)	7 (1)	1 (<1)	1 (<1)	2 (<1)	0 (0)	566 (100)
	3	276 (82)	44 (13)	6 (2)	6 (2)	0 (0)	0 (0)	4 (1)	0 (0)	336 (100)
	4	789 (75)	111 (10)	75 (7)	56 (5)	15 (1)	9 (1)	3 (<1)	1 (<1)	1059 (100)
	5	486 (73)	48 (7)	70 (10)	52 (8)	7 (1)	3 (<1)	1 (<1)	0 (0)	667 (100)
	6	479 (87)	59 (11)	4 (1)	8 (1)	0 (0)	1 (<1)	2 (<1)	0 (0)	553 (100)
	7	82 (78)	13 (12)	2 (2)	8 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	105 (100)
	8	98 (94)	2 (2)	0 (0)	4 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	104 (100)
total		2853 (80)	360 (10)	169 (5)	145 (4)	23 (<1)	20 (<1)	15 (<1)	1 (<1)	3586 (100)

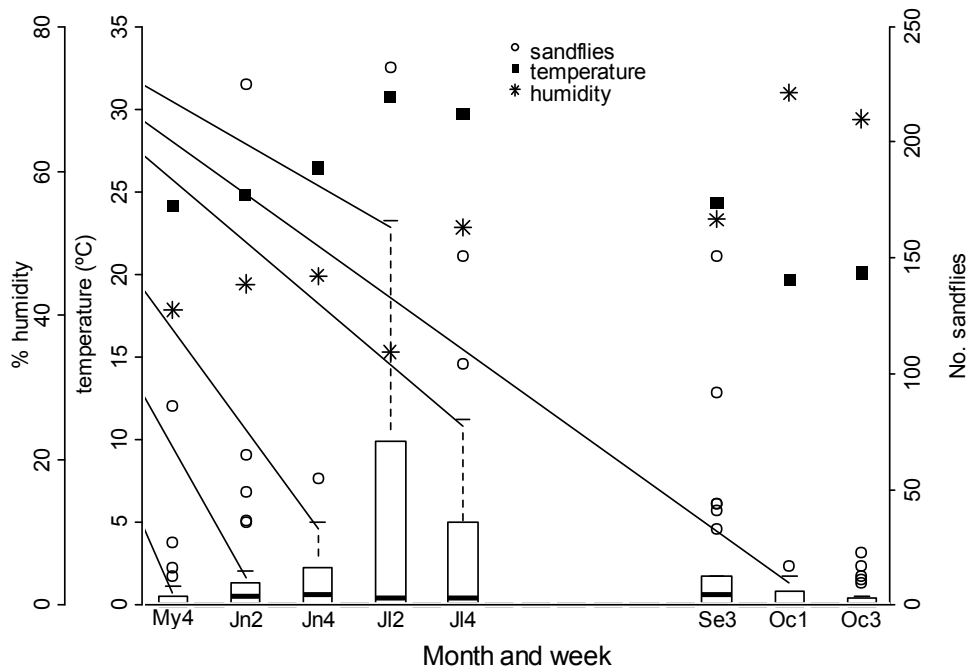


Figura 23. distribución estacional de los flebotomos en trampas luminosas por meses en base a la temperatura interior media y la humedad relativa (HR) medidas durante el intervalo en el que se colocaron las trampas.

El pico de abundancia de *P. perniciosus* en la segunda semana de julio con un total de 789 (Ai%= 75%) coincidió con la HR media más baja y la temperatura media más alta del estudio (Fig. 23). Esto se asoció con un cambio igualmente drástico en el clima regional, particularmente en los días en que se tomaron muestras de W, S y N. La HR máxima media, la temperatura y la velocidad media del viento en estas zonas fueron del 89%, 33 °C y 2,1 m/s el 3 de julio y 53%, 40 °C y 1,4 m/s el 7 de julio (Fig. 24). La fuerte asociación negativa entre la abundancia de *P. perniciosus* y la HR se refleja en la Tabla 3, que muestra la relación entre estas dos variables en el conjunto general de datos del estudio. Además, la altitud se correlacionó negativamente con la temperatura ($r = -0,21$) y la HR ($r = -0,37$) ($P < 0,05$).

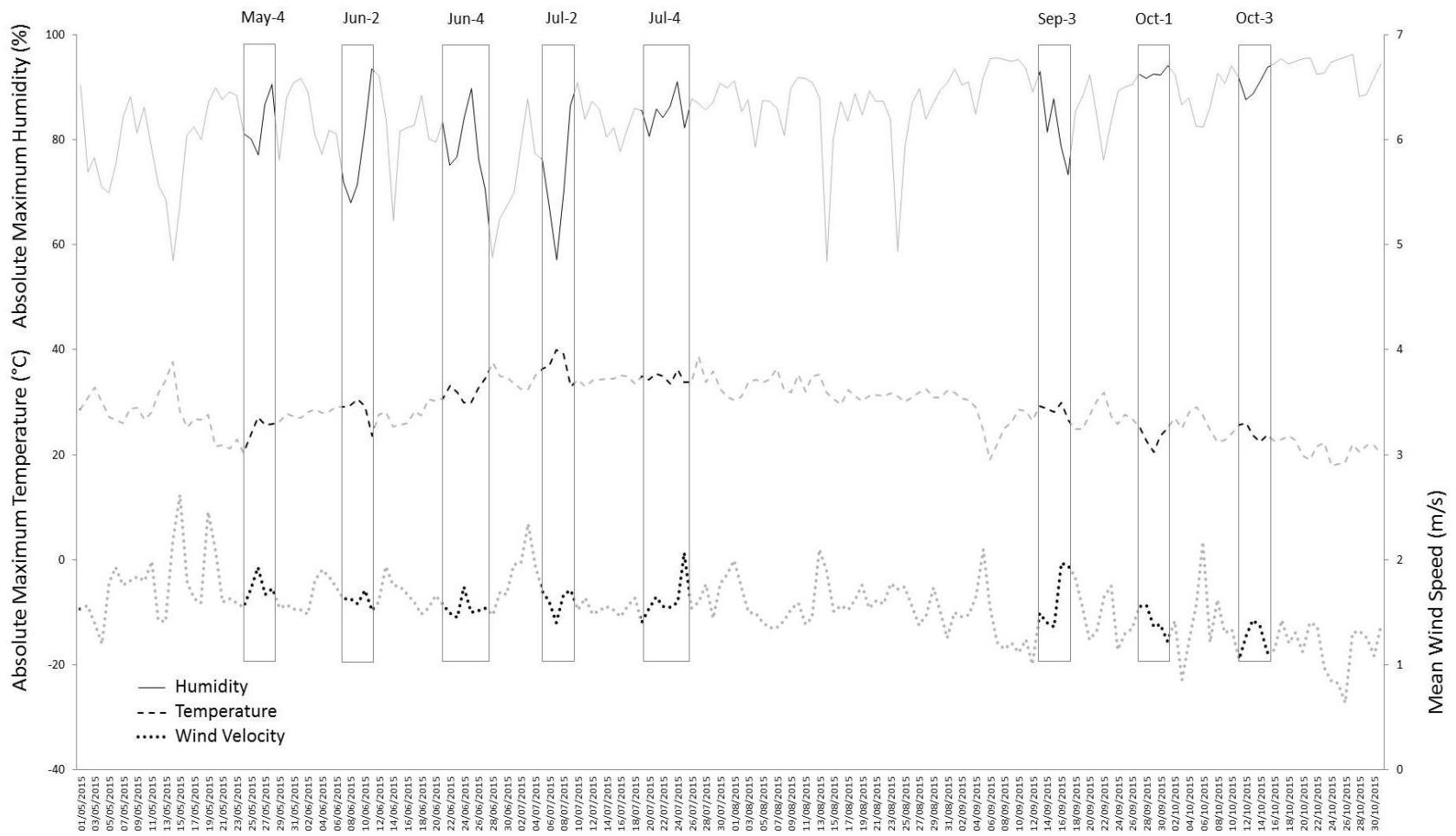


Figura 24. Temperatura máxima absoluta media, humedad y velocidad del viento en las estaciones meteorológicas más cercanas a los sitios de estudio.

1.13.4. Relación bivariante entre la abundancia de *P. perniciosus* en las trampas CDC y la temperatura y humedad relativa exterior, precipitación y velocidad del viento

La relación entre la abundancia de flebotomos y las variables medioambientales derivadas de registros realizados en las estaciones meteorológicas próximas a los lugares de muestreo se presentan en la Tabla 4. Tanto la proporción de trampas positivas como la abundancia en trampas positivas se asociaron negativamente y de forma consistente con la HR media de mayo-octubre y la velocidad máxima del viento de mayo-octubre y noviembre-abril (Tabla 4). De modo similar, se observaron asociaciones negativas entre la proporción de trampas positivas y la velocidad máxima anual y la máxima y media del viento entre noviembre y abril y la precipitación máxima anual, y entre la abundancia en trampas positivas y la temperatura máxima absoluta entre mayo y octubre. En cambio, la HR máxima en noviembre-abril se asoció positivamente con la abundancia de flebotomos (Tabla 4).

Tabla 3. Porcentaje de trampas con flebotomos y abundancia de flebotomos en trampas CDC positivas según la la humedad relativa y la temperatura en las instalaciones el día en que se recolectaron las trampas

Variable	Niveles	N	% trampas +vas	Intervalo de Confianza		P valor	Distribución de flebotomos en trampas positivas						
Humedad (%)	19-40	19	84	11	101	0.0012	78	2	10	65	151	232	0.0000
	41-50	50	74	12	86		26	1	3	15	36	225	
	51-60	28	75	13	91		26	1	3	9	33	151	
	61-70	33	64	14	80		6	1	2	3	9	23	
	71-86	35	37	15	53		4	1	2	3	4	11	
Temperatura (°C)	14-20	34	38	10	55	0.0018	9	1	3	5	13	23	0.7455
	21-22	19	63	11	85		16	1	3	4	14	86	
	23-24	31	65	12	81		20	1	5	10	23	151	
	25-26	22	91	13	103		18	1	2	8	38	65	
	27-28	23	70	14	88		42	1	5	11	53	225	
	29-30	16	63	15	86		33	2	2	6	38	151	
	31-33	20	85	16	101		50	1	2	11	76	232	

1.13.5. Relación bivariante entre la abundancia de *P. perniciosus* en las trampas CDC y el uso de la tierra, el suelo y los tipos de suelo

Después de excluir las asociaciones significativas entre el porcentaje de trampas positivas y abundancia de *P. perniciosus* y los usos de la tierra, tipos de suelo y tierra presentes en cantidades comparativamente pequeñas (por ejemplo, zonas urbanas y bosques de coníferas), y aquellas en las que no se observó una tendencia positiva o negativa consistente con la abundancia de *P. perniciosus*, los resultados obtenidos se podrían resumir de la siguiente forma. El porcentaje de trampas positivas y abundancia fue mayor en áreas con cantidades moderadas o grandes de tierra cultivable no irrigada, vegetación escasa y suelos arenosos en comparación con áreas con poca o ninguna cantidad de estos tipos de tierra (Tabla 5). La proporción de trampas positivas se asoció positivamente con los suelos de fluvisoles y la abundancia se asoció negativamente con los suelos coluviales y positivamente con los xerosoles petrocalcicos (Tabla 5).

Tabla 4. Porcentaje de trampas CDC con *P. perniciosus* y abundancia en trampas positivas según variables climáticas obtenidas de las estaciones meteorológicas.

Variable	Niveles (% rango)	Nu. trampas	% trampas +vas	95% IC		P valor	Distribución de flebotomos en trampas positivas							
							Media	Min.	25%	mediana	75%	100%	P valor	
Humedad Relativa (%)														
Media Mayo-Octubre	57.8-59.0	60	75	64	86	0.0019	53	1	10	17	50	203	<0.0001	
	59.1-61.3	86	63	53	73		22	1	3	7	18	214		
	65.5-74.3	38	39	24	55		2	1	1	1	2	5		
Máxima Noviembre-Abril	84.4-87.0	31	52	34	69	0.0567	3	1	1	2	5	10	0.0009	
	87.1-88.0	39	67	52	81		17	1	3	6	18	88		
	88.1-90.0	62	53	41	66		22	1	2	7	15	214		
	90.1-93.1	52	75	63	87		35	1	3	13	38	203		
Minima anual	36.7-38.0	37	81	68	94	0.0027	44	1	11	21	49	203	<0.0001	
	38.1-41.0	71	62	51	73		13	1	2	7	11	88		
	41.1-43.0	38	66	51	81		25	1	3	5	19	214		
	43.1-51.2	38	39	24	55		2	1	1	1	2	5		
Velocidad del viento (m/s)														
Maxima Mayo-Octubre	8.0-8.3	82	76	66	85	0.0001	32	1	4	12	31	214	<0.0001	
	8.4-8.7	40	70	56	84		19	2	5	10	17	88		
	8.8-9.2	24	38	18	57		2	1	1	2	3	5		
	9.3-10.4	38	39	24	55		2	1	1	1	2	5		
Máxima Noviembre-Abril	9.7-10.3	53	75	65	86	0.0000	22	1	3	7	18	214	<0.0001	
	10.4-11.0	61	75	64	87		37	1	10	17	42	203		
	11.1-11.8	24	43	29	58		3	1	1	2	4	14		
	11.9-12.4	46	33	14	52		2	1	1	2	2	4		
Maxima anual	8.9-9.3	53	75	64	87	0.0005	24	1	3	7	23	214	<0.0001	
	9.4-9.8	61	72	61	83		34	1	9	16	37	203		
	9.9-10.5	24	46	26	66		4	1	1	3	5	14		
	10.6-11.1	46	41	27	56		2	1	1	2	2	5		
Media Noviembre-Abril	0.8-1.6	54	76	65	87	0.0048	24	1	3	8	22	214	0.2488	
	1.7-2.4	106	60	51	70		24	1	2	9	21	203		
	2.5-3.3	24	38	18	57		4	1	2	3	5	14		

Tabla 4. Continuación

Variable	Niveles (% rango)	No. traps	% trampas +vas	95% IC		P valor	Distribución de flebotomos en trampas positivas						
							Media	Min.	25%	mediana	75%	100%	P valor
Precipitaciones (mm)													
Máximo anual	12.4-13.0	77	69	58	79	0.0057	22	1	4	9	18	214	<0.0001
	13.1-14.0	69	67	56	78		30	1	3	11	31	203	
	14.1-15.2	38	39	24	55		2	1	1	1	2	5	
Temperatura (°C)													
Máximo absoluto Mayo-Octubre	32.4, 34.0	67	63	51	74	0.7130	32	1	2	13	35	203	0.0007
	34.1, 35.0	78	64	53	75		23	1	3	9	19	214	
	35.1, 36.8	39	56	41	72		4	1	1	3	5	10	
Máximo Mayo-Octubre	24.1, 25.0	37	81	68	94	0.0046	44	1	11	21	49	203	0.0000
	25.1, 26.0	78	50	39	61		12	1	2	3	9	88	
	26.1, 27.3	69	65	54	76		17	1	1	5	15	214	
Máximo absoluto anual	26.7, 28.0	37	81	68	94	0.0022	44	1	11	21	49	203	0.0022
	28.1, 29.0	77	49	38	61		18	1	2	4	14	214	
	29.1, 30.0	31	77	63	92		19	1	4	9	21	88	
	30.1, 31.6	39	56	41	72		4	1	1	3	5	10	
Máximo anual	18.8, 20.0	53	72	60	84	0.08386	36	1	6	15	38	203	<0.0001
	20.1, 21.0	47	68	55	81		18	1	5	10	18	88	
	21.1, 22.0	45	49	34	63		24	1	1	2	12	214	
	22.1, 22.4	39	56	41	72		4	1	1	3	5	10	
Mínimo absoluto Noviembre-Abril	-3.3, -2.0	48	70	59	80	0.0101	31	1	5	14	32	203	0.0000
	-1.9, 1.0	22	71	55	87		37	1	12	34	62	88	
	1.1, 2.0	25	66	51	81		25	1	5	8	18	214	
	2.1, 2.7	19	41	27	56		2	1	1	1	3	10	

Tabla 5. Porcentaje de trampas CDC con *P. perniciosus* y abundancia en trampas positivas según el uso de la tierra, el suelo y los tipos de suelo.

Variable	Niveles (% rango)	Nu. Trampas	% trampas +vas	Intervalo de confianza		P valor	Distribucion de flebotomos en trampas positivas						
				95-	95+		Media	Min.	25%	mediana	75%	100%	P valor
Uso de la tierra													
Tierra cultivable no irrigada	00_04	147	57	24	65	0.0267	16	1	2	5	13	214	<0.0001
	10_35	23	83	25	98		42	1	12	17	52	203	
	62_73	14	79	26	100		37	3	8	12	40	141	
zonas con escasa vegetación	0-4	169	59	27	67	0.0196	22	1	2	5	17	214	0.0952
	23-53	15	93	28	106		26	1	7	11	40	88	
Playas, dunas, arena	0	176	60	29	67	0.0249	21	1	2	5	17	214	0.0038
	18	8	100	30	100		42	9	14	38	65	88	
Tipos de suelo													
Coluvial	0-6	130	65	32	73	0.4048	28	1	3	9	31	214	0.03453
	24-51	23	61	33	81		10	1	3	5	14	39	
	81-100	31	52	34	69		6	1	1	3	5	26	
Tipos de terreno													
Fluvisol	00_01	123	55	36	64	0.0111	20	1	2	5	17	203	0.2015
	14_28	15	60	37	85		23	1	1	8	10	141	
	72_100	46	80	38	92		27	1	5	9	26	214	
Xerosoles petrocálcicos	00_00	107	60	39	69	0.5642	16	1	2	5	11	214	0.0036
	02_09	16	56	40	81		14	1	1	10	17	57	
	72_100	61	67	41	79		34	1	5	13	36	203	

1.13.6. Relación bivalente entre la abundancia de *P. perniciosus* en trampas CDC, su distancia a superficies y planas y las características de los edificios, y los animales y su manejo

La proporción de trampas positivas y abundancia de flebotomos en las trampas positivas fue mayor en edificios antiguos, pequeños y poco desinfectados, con paredes de piedra o ladrillo sin enlucir (Fig. 25, C) y techos tradicionales hechos de caña y yeso, madera o ladrillos (Tabla 6). Estos edificios pertenecían principalmente a establos ganaderos de gran antigüedad con pequeños almacenes donde se encontraban los aperos de labranza antiguos sin utilidad, instalaciones descuidadas llenas de telarañas, lugares con polvo y instalaciones con los exteriores recubiertos de matorrales a su alrededor. Varios ejemplos quedan reflejados en la figura 25.



Figura 25. Ejemplos de las distintas instalaciones donde se colocaron las trampas: A) instalación de Beagles perteneciente a la Granja de Veterinaria de entre 2-20 años de antigüedad B) Rehala de perros en Yecla, Instalación de ladrillo enlucido de entre 2-20 años de antigüedad C) Establo de ovejas de piedra sin enlucir con más de 100 años de antigüedad situada en Archivel D) Perrera de ladrillo enlucido de entre 2-20 años de antigüedad situada en Campos de Rio E) Establo de ovejas de ladrillo enlucido de entre 30-50 años de antigüedad situado en Archivel.

La abundancia de flebotomos también fue numéricamente mayor en edificios mal ventilados con paja o lecho de tierra. Ni la proporción de trampas positivas ni la abundancia de flebotomos en las trampas positivas se asoció con las especies (ovejas y perros) o el número absoluto o densidad de animales. Tampoco el uso de tratamientos insecticidas afectó a la abundancia de los vectores, sin embargo, se observó una relación negativa entre el número de desinfecciones de las distintas instalaciones con el porcentaje de trampas positivas y abundancias encontradas del vector.

Por otro lado, la abundancia de flebotomos se asoció con la distancia de la trampa a la pared siendo máxima en aquellas trampas localizadas a como mucho 20 cm de distancia, pero la relación no siguió una tendencia positiva o negativa respecto a la densidad (Tabla 6). En la variable altura de la trampa no se observó relación significativa con el porcentaje de trampas positivas y tampoco con la abundancia de flebotomos.

Tabla 6. Porcentaje de trampas con flebotomos y abundancia de flebotomos en trampas CDC positivas según la posición de la trampa, características estructurales, especies de animales y prácticas de cría.

Variable	Niveles	N	% trampas vas+	Intervalo de confianza		P-valor	Distribución de flebotomos en trampas positivas						
				95-	95+		Mean	Min.	25%	median	75%	100%	P value
Edad de las instalaciones(años)	2-20	40	63	47	78	0.0240	4	1	1	3	5	9	<0.0001
	30-50	100	58	48	68		26	1	3	10	26	225	
	>100	36	83	71	96		37	1	4	11	51	232	
Techo interior/Estructura del techo	Caña y yeso	30	83	70	97	0.0484	30	1	5	10	13	232	0.0250
	Ladrillo	47	77	60	95		46	2	4	10	44	225	
	Metal	22	60	47	73		7	1	2	3	6	41	
	Madera	22	59	39	80		34	1	3	15	51	161	
	Hormigón	55	53	39	67		20	1	1	9	23	151	
Estructura de la pared	Piedra sin enlucir	29	83	69	97	0.0004	45	1	4	16	56	232	0.0438
	Ladrillo sin enlucir	30	77	64	90		11	1	4	9	11	76	
	Ladrillo enlucido	100	58	48	68		23	1	2	5	21	225	
	Piedra enlucida	8	13	0	35		1	1	1	1	1	1	
Lecho de los animales	Hormigón	69	61	49	72	0.5619	15	1	2	6	11	151	0.0384
	Paja/ tierra	107	66	57	75		29	1	3	10	26	232	

Tabla 6. Continuación

Variable	Niveles	N	% trampas vas+	Intervalo de confianza		P-valor	Distribución de flebotomos en trampas positivas						
				95-	95+		Media	Min.	25%	mediana	75%	100%	P valor
Volumen de las instalaciones (m ³)	16-209	45	82	71	93	0.0020	34	1	3	11	41	232	0.0021
	238-477	61	49	37	62		21	1	1	2	6	225	
	525-10000	70	66	55	77		18	1	3	9	15	151	
Volumen de instalaciones(m ³)/ Área abierta (m ²)	1-9	60	80	70	90	0.0071	16	1	3	6	11	161	0.0011
	10-29	77	56	45	67		19	1	2	4	13	225	
	52-125	39	56	41	72		51	1	12	30	58	232	
Desinfección anual de las instalaciones	0-2	76	79	70	88	0.0179	22	1	3	10	20	161	<0.0001
	3-8	61	61	48	73		47	1	8	17	55	232	
	24-365	39	56	41	72		4	1	1	3	5	9	
Especie animal principal	Perros	78	60	49	71	0.3771	21	1	2	6	22	151	0.2484
	Ovejas	114	68	59	76		28	1	3	9	20	232	
Densidad de animales	0.00-0.07	48	54	40	68	0.1219	15	1	3	5	12	151	0.1418
	0.08-0.18	59	63	50	75		33	1	3	12	26	225	
	0.24-2.16	69	72	62	83		22	1	2	7	11	232	

Tabla 6. Continuación.

Variable	Niveles	N	% trampas +vas	Intervalo de confianza		P-valor	Distribución de flebotomos en trampas positivas						
				95-	95+		Media	Min.	25%	mediana	75%	100%	P valor
Densidad de animales/área abierta	<1-4	85	64	53	74	0.9219	13	1	2	5	10	151	0.0169
	6-14	46	63	49	77		31	1	4	11	27	225	
	21-480	45	67	53	80		36	1	2	2	51	232	
Tratamiento insecticida anual sobre los animales	0	69	74	64	84	0.0638	33	1	4	10	26	232	0.4928
	1-3	61	57	45	70		26	1	2	11	36	161	
	5-17	38	76	63	90		17	1	3	8	11	92	
Distancia de la trampa al suelo (cm)	50_135	39	51	36	67	0.0173	44	1	3	20	44	225	0.3291
	150_180	67	78	68	88		22	1	2	9	20	161	
	190_225	78	63	52	74		22	1	3	9	17	232	
Distancia de la trampa a la pared (cm)	20	115	68	59	76	0.7389	30	1	3	10	32	232	0.0304
	30-60	30	63	46	81		15	1	2	3	8	161	
	100-600	39	62	46	77		20	1	2	10	15	92	
Distancia mínima de la trampa a los animales (cm)	30-50	81	72	62	81	0.1852	35	1	3	11	40	232	0.1211
	100-400	103	61	52	71		17	1	3	6	15	151	

1.13.7. Relación multivariante entre la abundancia de *P. perniciosus* y las variables ambientales estudiadas

La distribución de la abundancia de *P. perniciosus* se ajustaron adecuadamente a una distribución binomial negativa típica ($P > 0,05$). El modelo más parsimonioso del Tipo I (con datos de temperatura y HR del interior del edificio), incluyó una variable que combinaba la temperatura y la HR, la velocidad media máxima del viento entre mayo y octubre y la edad del edificio donde se colocó la trampa (Tabla 6). Las tasas de incidencia (*Incidence rate ratios*: IRR) fueron mayores para los niveles de HR más baja (19-40%) y de temperatura más alta (27-33°C), y disminuyeron con el aumento de la HR, alcanzando el máximo para una HR > 60% y temperatura < 22°C. Además, la IRR se asoció negativamente a la velocidad del viento y positivamente a la edad de los edificios, siendo máxima en los de más de 100 años de edad (Tabla 7). No fue posible obtener un modelo tipo I que incluyese además el edificio como efecto aleatorio.

Tabla 7. Tasas de incidencia de un modelo de distribución binomial negativa de la relación entre los conteos de flebótomos de *P. perniciosus* de las trampas CDC y la humedad relativa interior combinada (% RH) y la temperatura (T), velocidad máxima del viento de mayo a octubre y edad de construcción.

Variable	Niveles	Rate ratio	Intervalo de confianza		P-valor
% RH; T(°C)	19-40; 27-33	1.00	-	-	-
	19-40; 22-26	0.52	0.24	1.10	0.087
	41-60; 22-26	0.45	0.22	0.93	0.032
	41-60; 27-33	0.43	0.19	0.99	0.048
	61-79; 16-21	0.10	0.05	0.22	0.000
	61-79; 22-26	0.16	0.06	0.43	0.000
	61-79; 27-33	0.24	0.07	0.89	0.033
Velocidad del viento máxima (m/s)	9.2-10.4	1.00	-	-	-
	8.0-8.6	6.55	2.57	16.72	0.000
	8.7-9.1	1.90	0.52	6.98	0.332
Edad de las instalaciones(años)	0-10	1.00	-	-	-
	30-50	3.45	1.57	7.57	0.002
	>100	4.98	2.12	11.71	0.000

Entre los modelos Tipo II, el de AIC más bajo indicó que la abundancia de flebotomos estaba negativamente asociada con la precipitación, la temperatura máxima y la velocidad media máxima del viento entre mayo y octubre. El elevado valor de la desviación típica de la variable aleatoria “edificio” reveló una amplia variabilidad entre edificios en los que se colocaron las trampas, aunque como se deduce del bajo valor de la desviación en la variable aleatoria “semanas”, la variabilidad entre edificios permaneció constante durante el estudio (Tabla 8).

Tabla 8. Estimaciones de un modelo de distribución Binomial Negativa multinivel en el que se observa la relación entre la abundancia de *P. perniciosus* en trampas CDC y variables ambientales, incluyendo precipitación de mayo a octubre (II) y la media de temperatura máxima (T^º) y velocidad del viento.

Variable	Estimación	Error estándar	P-valor
Modelo tipo II			
Componentes fijos			
Intersección	44.8144	6.9262	0.000
Precipitación	-0.1540	0.0604	0.010
Temperatura máxima (°C)	-1.0543	0.2056	0.000
Velocidad de viento máxima (m/s)	-1.3134	0.2405	0.000
Efectos aleatorios	Desviación estandar		
localización (intersección)	0.8566		
Semana (pendiente)	0.0068		

1.14. Estudio de la prevalencia de infección de *L. infantum* en fauna silvestre del sureste de España

1.14.1. Porcentaje de animales rtPCR positivos y distribución de los valores de Ct

La Tabla 9 presenta el porcentaje de los animales del estudio que fueron rtPCR-positivos (prevalencia) en piel y órganos. La prevalencia global considerando como infectados los animales rtPCR-positivos en piel y/o órganos fue 32% (64/202) y según la especie fue 45% en zorros, 30% en conejos y garduñas, 0% en ratas negras y osciló entre el 0-100% en especies minoritarias incluyendo tejones, gatos monteses, lobos, mapaches, jinetas y liebres (Tabla 9).

En total se analizaron 431 muestras de tejido de los 202 animales y el porcentaje de muestras rtPCR-positivas fue 16% (68/431) y dependiendo del tejido fue 19% (32/168) en piel, 17% (33/190) en bazo, 4% (3/69) en hígado y 0% (0/4) en ganglio linfático. Sin embargo, la concordancia entre los resultados de la rtPCR según el tejido fue baja y sólo el 8% de los animales positivos a la rtPCR resultaron positivos tanto en muestras de piel como de órganos (bazo o hígado). Entre los conejos y zorros de los que se obtuvieron muestras de piel y órganos, la proporción de muestras de piel y órganos rtPCR-positivas fue de 20/3 para los conejos y de 4/16 para los zorros, respectivamente, lo que indica que los conejos tuvieron mayor probabilidad de ser positivos en la piel que en los órganos y lo contrario en el caso de los zorros ($p < 0,05$). Globalmente, el porcentaje de animales rtPCR-positivos en uno, dos o tres tejidos diferentes fue del 31%, 35% y 27%, respectivamente ($p > 0,05$).

Los ciclos umbrales de rtPCR en las muestras positivas oscilaron entre 10 y 38, y el 21% de las muestras tuvieron valores de Ct superiores a 35 lo que indica una baja carga parasitaria (Tabla 9). No hubo diferencias significativas en la mediana de Ct entre animales o tejidos, aunque solamente se observaron valores de Ct inferiores a 30 en zorros, conejos y ratones de campo (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de *L. infantum* rtPCR positivos y distribución de medianas de Ct (rango) en carnívoros silvestres, lagomorfos y roedores del sudeste de España entre los años 2013-2017.

Especie	Todos los tejidos				Piel				Órganos			
	N	% +vos.	95% CI	Valor Ct	N	% +vos.	95% CI	Valor Ct	N	% +vos.	95% CI	Valor Ct
Conejo ^a	80	30	20-40	32 (26-37)	80	26	17-36	32 (26-37)	80	5	0-10	32 (26-37)
Zorro ^b	69	45	33-57	33 (10-38)	45	9	1-17	30 (20-36)	69	39	28-51	33 (10-38)
Ratón campo ^c	16	19	0-38	22 (22-23)	15	20	0-40	28 (25-29)	15	20	0-40	22 (21-23)
Garduña ^d	10	30	2-58	34 (34-38)	7	14	0-40	34 (34-34)	10	20	0-45	34 (34-38)
Rata negra ^e	10	0	0	-	8	0	0	-	10	0	0	-
Tejón ^f	6	0	0	-	6	0	0	-	4	0	0	-
Gato montés ^g	4	25	0-67	36 (36-36)	2	50	0-100	36 (36-36)	4	0	0	36 (36-36)
Lobo Ibérico ^h	3	33	0-87	35 (35-35)	3	33	0-87	35 (35-35)	0	-	-	-
Mapache ⁱ	2	0	0	-	0	0	0	-	2	0	-	-
Gineta ^j	1	100	100	32 (32-32)	1	100	100	32 (32-32)	0	-	-	-
Liebre ibérica ^k	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	-	-
Total	202	32	25-38	33 (29-38)	168	19	13-25	32 (20-37)	195	18	13-24	33 (10-38)

^a*Oryctolagus cuniculus*, ^b*Vulpes vulpes*, ^c*Apodemus sylvaticus*, ^d*Martes foina*, ^e*Rattus rattus*, ^f*Meles meles*, ^g*Felis silvestris*, ^h*Canis lupus*, ⁱ*Procyon lotor*, ^j*Genetta genetta*, ^k*Lepus granatensis*

1.15. Relación entre la positividad a la PCR y las variables explicativas

La prevalencia de animales rtPCR-positivos según la Comunidad Autónoma fue del 32% en la CARM, 33% en la CV y 0% en la CA ($p>0,05$) y varió significativamente entre las principales zonas geoclimáticas de la CARM, oscilando entre 64% en la zona sur (S) y 10% en el sureste (SE) de la región ($p<0,05$) (Tabla 11; Fig. 26).

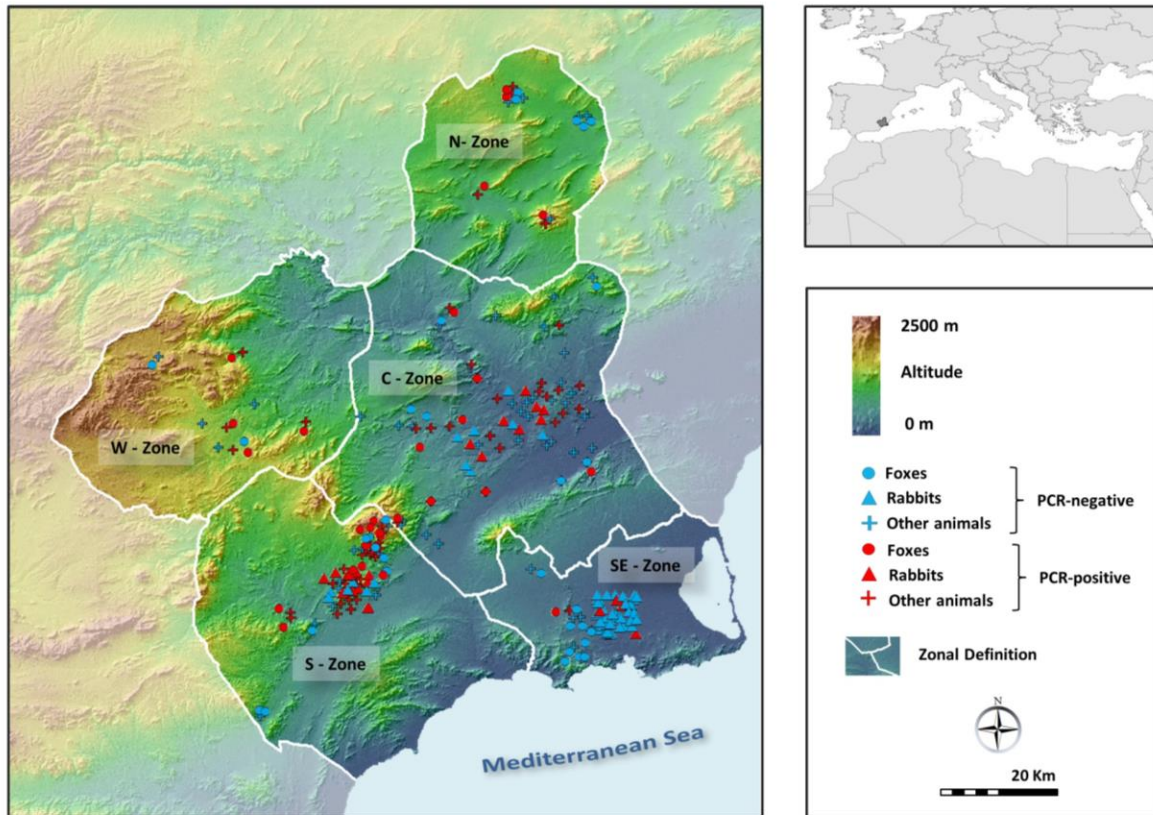


Figura 26. Distribución de animales silvestres positivos y negativos a la infección de *Leishmania infantum*

La disparidad en la prevalencia en la CARM obedeció a claras diferencias ambientales entre las zonas estudiadas. La prevalencia en zorros y conejos, las especies más abundantes y ampliamente distribuidas, aumentó con la altitud y disminuyó con la precipitación, HR, temperatura y velocidad media máxima del viento de mayo a octubre (Tabla 12).

Además, se observaron diferencias en la prevalencia según la estación de año y el sexo de los animales y fue máxima en invierno y mínima en primavera ($p < 0,05$), y marginalmente mayor en las hembras que en los machos ($p < 0,10$). Por el contrario, la prevalencia no se asoció significativamente a la edad, peso y condición corporal de los animales ($p > 0,05$) (Tabla 11).

El modelo de regresión logística confirmó la asociación independiente de la positividad a la rtPCR en la CARM y la zona geográfica, estación y especie hospedadora. El riesgo de infección fue significativamente mayor en los animales del sur que en los del sureste, en los capturados en invierno en comparación con la primavera y en zorros y garduñas en comparación con roedores (Tabla 10).

Tabla 10. Estimaciones del modelo de regresión logística multivariable de la relación entre el estado de *Lertmania infantum* rtPCR y las variables ambientales y las especies animales.

Variable	Niveles	rtPCR Odds ratio	95-	95+	P- valor
Zonas geográficas de la CARM	Sureste	1			
	Central	5.64	0.72	44.34	0.1003
	Norte	2.87	0.32	25.50	0.3434
	Oeste	3.35	0.36	31.01	0.2872
	Sur	10.10	1.52	67.06	0.0166
Estación	Primavera	1			
	Otoño	1.79	0.34	9.47	0.4923
	Verano	4.01	0.64	25.34	0.1396
	Invierno	5.14	1.30	20.28	0.0195
Especies silvestres	Roedores	1			
	Zorros	6.87	1.19	39.63	0.0312
	Garduña	10.31	0.46	233.72	0.1428
	Lagomorfos	5.38	0.43	67.44	0.1920
	Otros carnivoros	3.71	0.52	26.58	0.1924

Tabla 11. Prevalencia (rtPCR) de *L. infantum* (95% CI) en fauna silvestre del Sureste español en base a las variables independientes.

Variable	niveles	Animales		Zorros		Conejos		Garduñas		Ratón de campo	
		No.	%+ves.	No.	% +ves.	No.	% +ves.	No.	% +ves.	No.	% +ves.
Región ¹	CARM	188	32 (25-39)	62	47 (34-59)	80	30 (20-40)	5	20 (0-55)	16	19 (0-38)
	CV	12	33 (7-60)	7	29 (0-62)		-	3	67 (13-100)	0	-
	A	2	0	0	-	0	-	2	0	0	-
Zonas CARM	Central	71	31 (20-42)	15	47 (21-72)	15	53 (28-79)	4	25 (0-67)	14	21 (0-43)
	Sureste	60	10 (2-18)	13	15 (0-35)	47	9 (1-16)	0	-	0	-
	Sur	37	65 (49-80)**	19	63 (41-85)	18	67 (45-88)**	0	-	0	-
	Norte	10	40 (10-70)	9	44 (12-77)	0		1	0	0	-
	Oeste	10	40 (10-70)	6	67 (29-100)*	0		0	-	2	0
Estación	Invierno	48	60 (47-74)**	33	58 (41-74)	9	78 (51-100)	0	-	5	60 (17-100)*
	Primavera	30	17 (3-30)	8	25 (0-55)	0		1	100	8	0
	Verano	10	60 (30-90)	6	83 (54-100)	0		0	-	1	0
	Otoño	17	29 (8-51)	9	56 (23-88)	0		1	0	2	0
Sexo	Machos	106	29 (21-38)	43	44 (29-59)	31	19 (5-33)	8	25 (0-55)	10	20 (0-45)
	Hembras	85	35 (25-45)	21	43 (22-64)	43	42 (27-57)*	2	50 (0-100)	6	17 (0-46)
Edad	Juveniles	22	50 (29-71)	19	58 (36-80)	0	-	2	0	0	-
	Adultos	69	33 (22-44)	47	36 (22-50)	0	-	8	38 (4-71)	0	-
Peso	Bajo	48	44 (30-58)	37	49 (33-65)	0	-	4	50 (1-99)	7	14 (0-40)
	Optimo	40	33 (18-47)	27	37 (19-55)	0	-	4	25 (0-67)	9	22 (0-49)
Condición corporal	Bajo	26	31 (13-49)	20	35 (14-56)	0	-	3	33 (0-87)	0	-
	Optimo	25	44 (25-63)	19	47 (25-70)	0	-	2	50 (0-100)	0	-

¹Región de Murcia (CARM), Comunidad autónoma de Valenciana (CV) and Comunidad autónoma de Andalucía (CA)

* p<0.10, **p<0.05. el asterisco se colocó en la categoría con el mayor porcentaje.

Tabla 12. Prevalencia de *L. infantum* en zorros y conejos en la CARM según la altitud, precipitaciones medias, la humedad relativa, la temperatura y la velocidad máxima del viento de mayo a octubre.

Variable	Nivel	N° de animales	% +vos	95% CI	p-valor
Altitud	5-54	49	10	2-19	<0.0001
	95-294	34	38	22-55	
	343-736	36	56	39-72	
	802-1263	25	64	45-83	
Precipitaciones (mm)	22.1-24.0	58	60	48-73	<0.0001
	24.1-25.9	85	21	12-30	
% Humedad relativa(RH)	58.3-61.5 (RH1)	78	58	47-69	<0.0001
	61.7-67.5 (RH2)	65	12	4-20	
Temperatura (°C)	18.9-22.3 (T1)	55	58	45-71	<0.0001
	22.5-23.18 (T2)	88	24	15-33	
% RH; T (°C)^a	RH1-T1	57	60	47-72	<0.0001
	RH1-T2	22	55	34-75	
	RH2-T2	64	11	3-19	
Velocidad máxima del viento (m/s)	7.3-8.4	36	53	36-69	<0.0001
	8.5-9.4	45	62	48-76	
	9.5-10.6	62	10	2-17	

^aCombinación de Humedad relativa (RH %) y Temperatura(T)

1.16. Estudio longitudinal de anticuerpos frente a la saliva de los flebotomos en perros tratados con insecticida

1.16.1. Western blots de las proteínas salivares de *P. papatasi* y *P. perniciosus*

Se observó una marcada respuesta en el WB de los sueros seleccionados a las proteínas recombinantes rSP32 de *P. papatasi* y rSP03B de *P. perniciosus* (Figura 27), lo que confirmó su utilidad para detectar la exposición natural de los perros a la saliva de estas especies. A diferencia de la proteína rSP03B, rSP32 mostró varias bandas teñidas, 2 bandas gruesas con pesos moleculares de 60 y 50 KDa aproximadamente en 2 de las tiras positivas, mientras que en la otra tira positiva solo presenta la banda de 60 KDa. Además, en las tres tiras se observó una banda positiva de 30KDa y en 2 de las tiras otra banda de 25KDa.

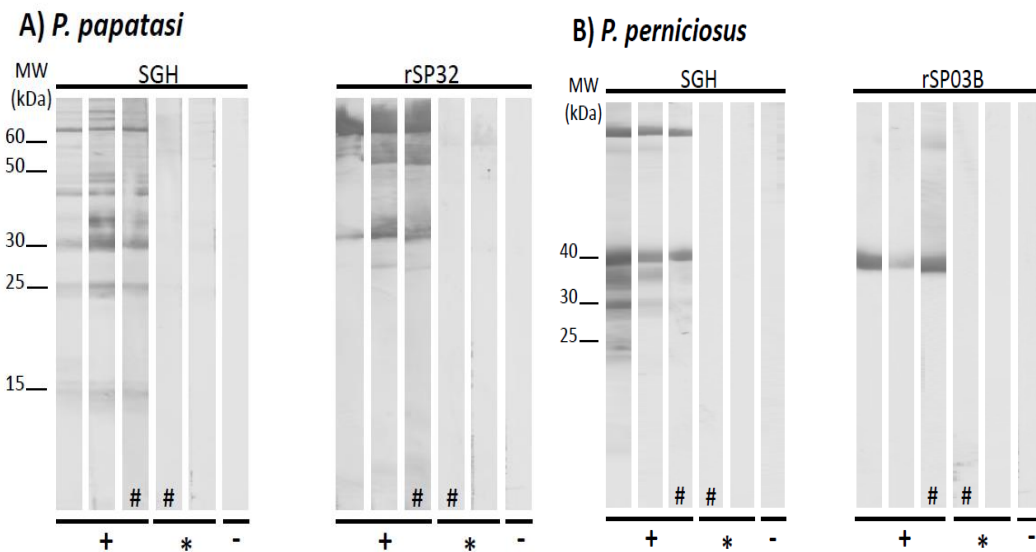


Figura 27. Análisis de Western blot del suero canino para la saliva de la especie *P. papatasi* (SGH) y la proteína recombinante SP32 (A) y la saliva completa de *P. perniciosus* y la proteína amarilla SP03B (B). (#) mezcla de sueros caninos; (+) Sueros caninos positivos a la técnica ELISA anti-saliva; (*) suero canino al inicio del estudio (-) suero de perros negativos.

De igual modo y como era de prever, en los WB de los SGH de ambas especies se observaron fuertes reacciones a proteínas con distintos pesos moleculares (Figura 27). En

el WB de SGH de *P. perniciosus* la reacción más intensa fue con una proteína de un peso molecular de 43 kDa, que se corresponde con la familia de “yellow-related proteins”. En el caso del SGH de *P. papatasi*, los sueros caninos reconocieron principalmente proteínas de peso molecular de 25 kDa a 50 kDa y sobre todo de 30 kDa correspondiente a la proteína rSP32.

1.16.2. Densidad óptica de anticuerpos ELISA frente a las proteínas salivares de *P. papatasi* y *P. perniciosus*

La distribución de LODs no se ajustó a una función normal y la mediana (rango) de LOD para los antígenos rSP32 y SGH de *P. papatasi* fue de 16 (0-55) y 11 (0-39), respectivamente, y para los antígenos rSP03B y SGH de *P. perniciosus* fue de 8 (0-43) y 10 (0-43), respectivamente.

En relación con los niveles pre-exposición, los LODs aumentaron (el doble o más) durante el estudio excepto en tres perros para el antígeno rSP32 de *P. papatasi*, en un perro para el antígeno SGH de *P. papatasi* y en dos perros para el antígeno rSP03B de *P. perniciosus*. Se detectó un claro patrón estacional en la mediana de los LODs con diferencias significativas entre los tres grupos de exposición a flebotomos (APR14, JUN14 y MAR15), particularmente en junio y julio de 2015, cuando los LODs fueron significativamente mayores en los perros APR14 (segundo año de exposición a flebotomos) en comparación con los perros MAR15 (primer año de exposición a flebotomos) (Tablas 13 y 14). Los picos iniciales de LOD se observaron en junio de 2014 en perros APR14, en octubre de 2014 en el caso de perros JUN14 y en junio de 2015 en los perros MAR15. La mediana de LODs en perros APR14 y JUN14, disminuyó durante el invierno 2014-15 y la primavera 2015. Las LOD volvieron a subir bruscamente en junio y julio de 2015 para todos los antígenos y perros, excepto para rSP03B de *P. perniciosus* en el grupo JUN14 (sólo 3 perros) que permaneció bajo durante el verano de 2015 (Tablas 13 y 14).

Tabla 13. Distribución temporal de la media (rango) en los LOD de anticuerpos de perro contra las proteínas salivales de *P. papatasi* según el grupo de exposición

Año	Mes	rSP32				SGH			
		Grupo de exposición ¹				Grupo de exposición ¹			
		APR14	JUN14	MAR15	All	APR14	JUN14	MAR15	All
2014	Abril	6 (0-23)	-	-	6 (0-23)	3 (2-26)	-	-	3 (2-26)
	Junio	22 (5-41)	10 (5-13)	-	20 (5-41)	9 (4-25)	5 (2-5)	-	8 (2-25)
	Octubre	17 (6-29)	25 (0-27)	-	20 (0-41)	10 (6-23)	7 (4-7)	-	10 (4-23)
2015	Abril	13 (0-31)	14 (1-27)	6 (2-29)	11 (0-31)	7 (3-25)	4 (3-6)	1 (1-13)	6 (1-25)
	Mayo	13 (6-28)	23 (0-25)	6 (4-33)	13 (0-33)	8 (4-24)	5 (3-5)	3 (1-9)	6 (1-24)
	Junio	29 (5-50)	23 (0-26)	19 (2-39)	24 (0-50)	26 (7-39)	9 (8-10)	10 (2-14)	18 (2-39)
	Julio	27 (9-51)	25 (7-28)	11 (3-34)	24 (9-34)	22 (2-33)	11 (8-14)	13 (4-29)	16 (2-33)
	Agosto	18 (0-42)	17 (0-24)	16 (2-32)	17 (0-42)	20 (3-36)	6 (4-8)	10 (3-17)	13 (3-36)
	Septiembre	21 (6-46)	17 (2-21)	13 (5-32)	18 (2-46)	16 (0-36)	6 (4-9)	11 (6-16)	15 (0-36)
	Octubre	27 (4-49)	27 (5-33)	17 (8-35)	22 (4-35)	12 (0-34)	6 (4-10)	10 (0-13)	10 (0-34)
	Noviembre	24 (7-42)	23 (4-31)	9 (0-33)	23 (0-42)	14 (4-31)	5 (4-16)	7 (2-19)	12 (4-31)
2016	Enero	14 (2-33)	17 (4-21)	8 (5-22)	13 (2-33)	13 (7-24)	8 (5-10)	11 (8-14)	12 (5-24)
	Febrero	14 (3-29)	15 (3-20)	8 (4-21)	13 (3-29)	11 (5-22)	8 (7-11)	14 (1-14)	11 (1-22)
	Marzo	13 (6-24)	11 (5-22)	9 (5-20)	13 (5-24)	14 (4-27)	11 (7-21)	11 (5-16)	13 (4-27)
	Abril	11 (5-25)	15 (7-21)	11 (4-22)	11 (4-25)	16 (10-27)	13 (11-19)	11 (2-20)	16 (2-27)
Total		17 (0-51)	17 (0-33)	10 (0-55)	16 (0-55)	12 (0-39)	7 (2-21)	9 (0-29)	11 (0-39)

¹ Grupos de exposiciones: APR14, JUN14 and MAR15, en base a el momento de incorporación de los perros al estudio: April 2014, June 2014 and March 2015, respectivamente

Tabla 14. Distribución temporal de la media (rango) en los LOD de anticuerpos de perro contra las proteínas salivales de *P. perniciosus* según el grupo de exposición

Año	Mes	rSP03B				SGH			
		Grupo de exposición ¹				Grupo de exposición ¹			
		APR14	JUN14	MAR15	all	APR14	JUN14	MAR15	all
2014	Abril	2 (0-12)	-	-	2 (0-12)	3 (1-9)	-	-	3 (1-9)
	Junio	9 (0-21)	4 (2-5)	-	7 (0-25)	7 (2-17)	4 (3-5)	-	7 (2-17)
	Octubre	14 (5-26)	6 (4-10)	-	12 (4-26)	12 (6-39)	7 (4-7)	-	11 (4-39)
2015	Abril	5 (0-12)	3 (3-3)	5 (5-22)	4 (0-22)	6 (2-13)	4 (2-7)	2 (1-6)	5 (2-13)
	Mayo	12 (1-43)	3 (1-4)	2 (4-7)	6 (1-43)	12 (5-37)	6 (6-8)	3 (1-8)	8 (1-37)
	Junio	17 (2-39)	2 (1-5)	9 (14-19)	11 (1-39)	19 (4-43)	7 (5-7)	9 (3-18)	12 (3-43)
	Julio	20 (1-38)	2 (1-7)	5 (10-20)	12 (1-38)	18 (3-38)	5 (2-13)	7 (4-27)	16 (2-38)
	Agosto	12 (0-30)	1 (0-12)	8 (13-16)	12 (0-30)	14 (4-41)	5 (3-11)	8 (2-15)	12 (2-41)
	Septiembre	15 (2-32)	1 (0-7)	5 (16-24)	13 (0-32)	11 (2-34)	6 (2-15)	13 (1-33)	11 (2-34)
	Octubre	11 (0-28)	2 (0-10)	12 (14-20)	10 (0-28)	16 (5-34)	4 (3-12)	11 (3-26)	15 (3-34)
	Noviembre	10 (0-33)	7 (2-16)	7 (11-19)	10 (0-33)	14 (4-39)	5 (4-17)	15 (0-26)	14 (0-39)
	Diciembre	11 (0-33)	1 (1-12)	9 (12-18)	11 (0-33)	13 (6-35)	6 (3-11)	11 (2-16)	11 (2-35)
2016	Enero	9 (0-32)	6 (0-6)	4 (5-7)	6 (0-32)	11 (2-36)	4 (3-10)	7 (3-17)	10 (2-36)
	Febrero	7 (0-25)	1 (0-9)	2 (5-10)	6 (0-25)	10 (4-31)	5 (2-15)	9 (0-11)	9 (2-31)
	Marzo	8 (2-33)	7 (3-13)	10 (11-13)	8 (2-33)	11 (2-32)	7 (4-15)	5 (0-18)	11 (0-32)
	Abril	12 (0-31)	9 (0-13)	7 (9-15)	11 (0-31)	13 (7-27)	8 (5-18)	12 (10-16)	13 (5-27)
Total		10 (0-43)	3 (0-16)	5 (0-24)	8 (0-43)	11 (1-43)	6 (2-18)	8 (0-33)	10 (0-43)

¹ Grupos de exposiciones: APR14, JUN14 and MAR15, en base a el momento de incorporación de los perros al estudioudy: April 2014, June 2014 and March 2015, respectivamente

Se observó otro pico en la mediana de LOD entre septiembre y noviembre de 2015, particularmente para el antígeno rSP32 de *P. papatasi* en todos los grupos (Tabla 13) y en menor medida para el antígeno SGH de *P. perniciosus* en los grupos APR14 y MAR15 (Tabla 14). Las LOD en los dos grupos anteriores disminuyeron durante el invierno de 2015-16 y se observó un nuevo y ligero aumento en la mediana de LOD en marzo y abril de 2016 para los antígenos de *P. perniciosus* (Tabla 14) y SGH de *P. papatasi* (Tabla 13).

Globalmente, la correlación entre los LODs de los antígenos rSO3B y SGH de *P. perniciosus* fue alta ($\rho=0,70$; IC del 95%: 0,65-0,75), mientras que la correlación entre los antígenos de *P. papatasi* rSP32 y SGH fue sólo moderada ($\rho=0,46$; 0,38-0,52).

1.16.3. Porcentaje de perros positivos a las pruebas ELISA frente a las proteínas salivares de *P. papatasi* y *P. perniciosus*

Los valores de LOD que se tomaron como punto de corte de los ELISA para los antígenos rSP32 y SGH de *P. papatasi* y rSP03B y SGH de *P. perniciosus* fueron 29,3, 26,5, 22,2 y 8,6, respectivamente. De este modo, el porcentaje (IC 95%) de muestras positivas a anticuerpos (seropositivas) a rSP32 y SGH de *P. papatasi* y rSP03B y SGH de *P. perniciosus* fue 14% (11-17%), 6% (4-8%), 8% (6-11%) y 57% (52-61%), respectivamente. De manera similar, el porcentaje de perros seropositivos (seroprevalencia) para estos antígenos fue de 53% (36-70%), 38% (21-54%), 31% (15-47%) y 94% (85-100%), respectivamente. Sin embargo, la seroprevalencia difirió entre los grupos de exposición a flebotomos y fue significativamente mayor en los perros APR14 para todos los antígenos en comparación con otros perros. Por ejemplo, la seroprevalencia para rSP32 y rSP03B fue del 64% (44-84%) y 41% (20-61%), respectivamente, para los perros APR14, y del 29% (0-62%) y 14% (0-40%), respectivamente, para los perros MAR15 ($p<0,05$).

Al igual que los LODs, la seroprevalencia canina fue estacional, especialmente en los perros AP14 para todos los antígenos y para el antígeno SGH de *P. perniciosus* en los perros MAR15 (Figura 28 y Figura 29).

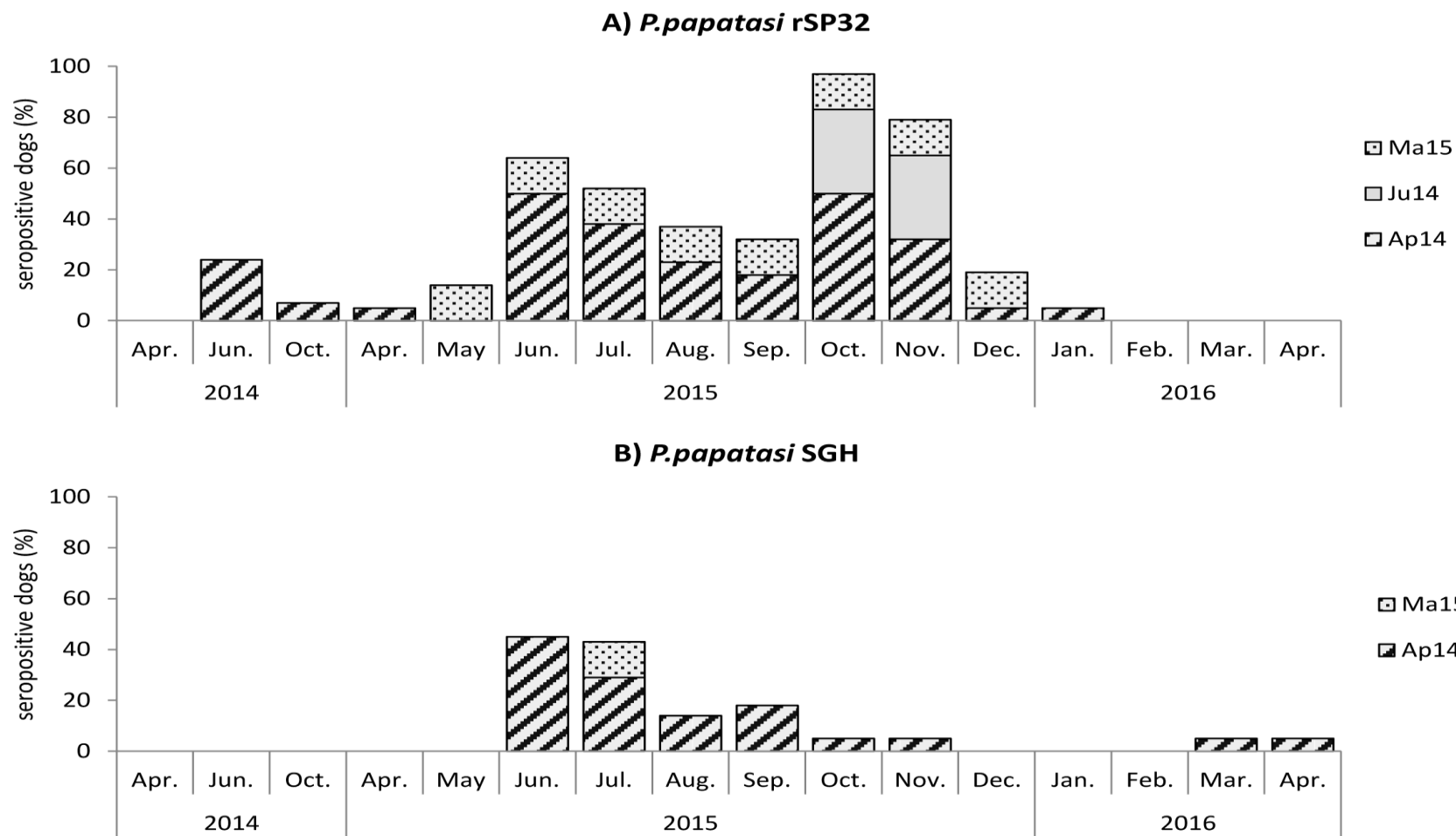


Figura 28. Distribución temporal del porcentaje (95% CI) de perros seropositivos a la proteína recombinante de *P. papatasi* (rSP32) y el SGH según los grupos de perros expuestos AP14, JU14 y MA15 (los perros se incorporaron en el estudio: abril de 2014, junio de 2014 y marzo de 2015, respectivamente)

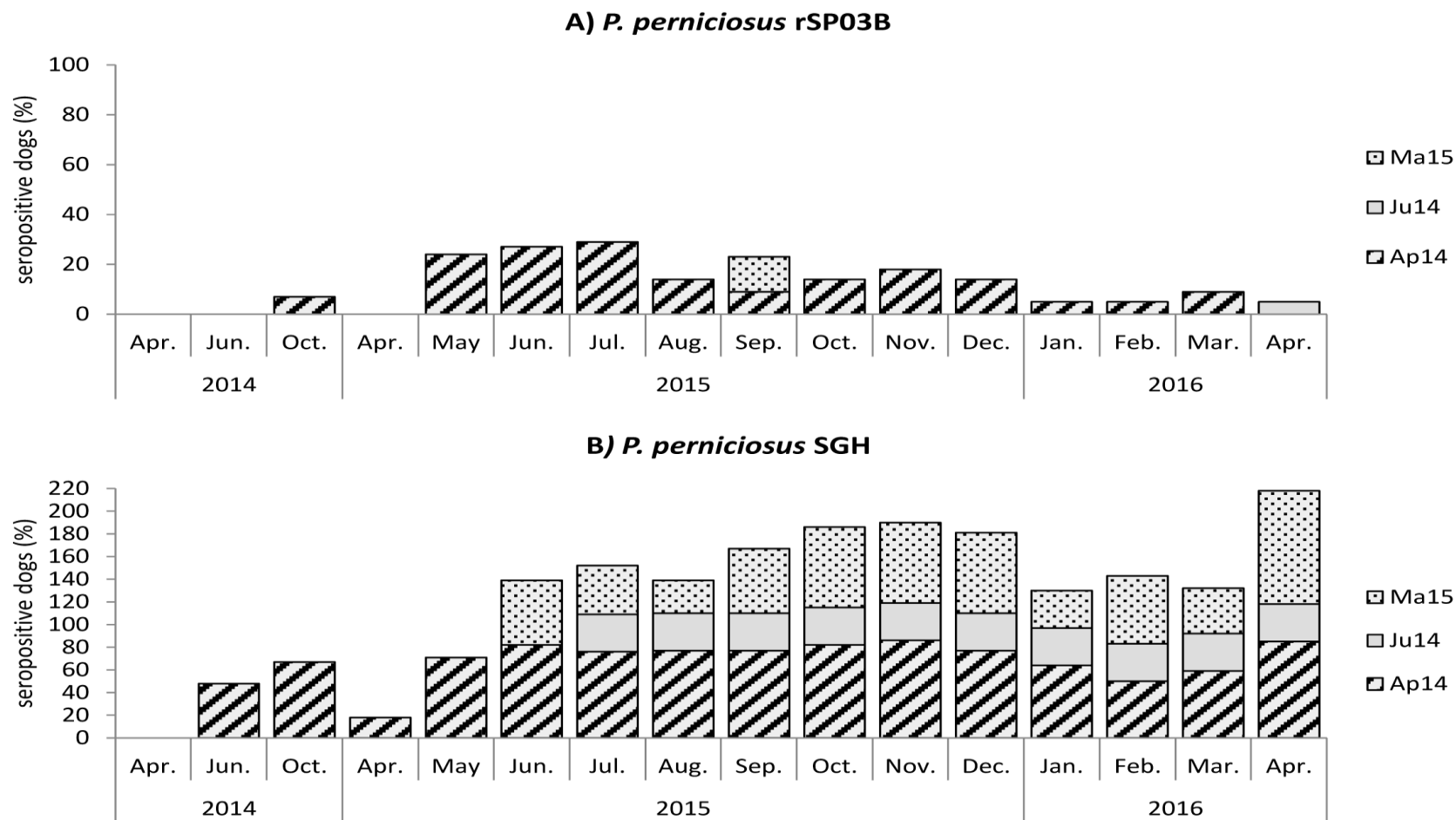


Figura 29. Distribución temporal del porcentaje (95% CI) de perros seropositivos a la proteína recombinante de *P. perniciosus* (rSP03) y el SGH según los grupos de perros expuestos AP14, JU14 y MA15 (los perros se incorporaron en el estudio: abril de 2014, junio de 2014 y marzo de 2015, respectivamente)

1.16.4. Relación multivariable entre los LODs ELISA y el tiempo, edad y sexo

La Tabla 15 describe los resultados de un modelo de regresión lineal mixta que investiga la cinética de anticuerpos frente a antígenos salivares en perros APR14, ajustado a la edad del perro. No se incluyó el sexo del perro en el modelo ya que no se relacionó significativamente con la LOD.

Los resultados confirman el aumento significativo de la LOD dos meses después del inicio del experimento en junio de 2014, su disminución durante el invierno 2014-15, el nuevo aumento en la primavera-verano 2015 a niveles de más del doble que los del mismo mes del año anterior y la caída más leve durante el invierno 2015-16 (Tabla 15). Además, la LOD media varió según el antígeno y fue más alta para rSP32 y más baja para rSP03B.

Por último, el modelo indicó una amplia variabilidad en la respuesta humoral de los perros de modo que el 28% $[(17.85 / (17.85 + 46.68))] \times 100$ de la variabilidad en la LOD se asoció a diferencias entre los perros (Tabla 14). Por otra parte, se observó una elevada autocorrelación entre las LOD de muestreos sucesivos siendo el coeficiente de correlación $\Phi = 0,43$.

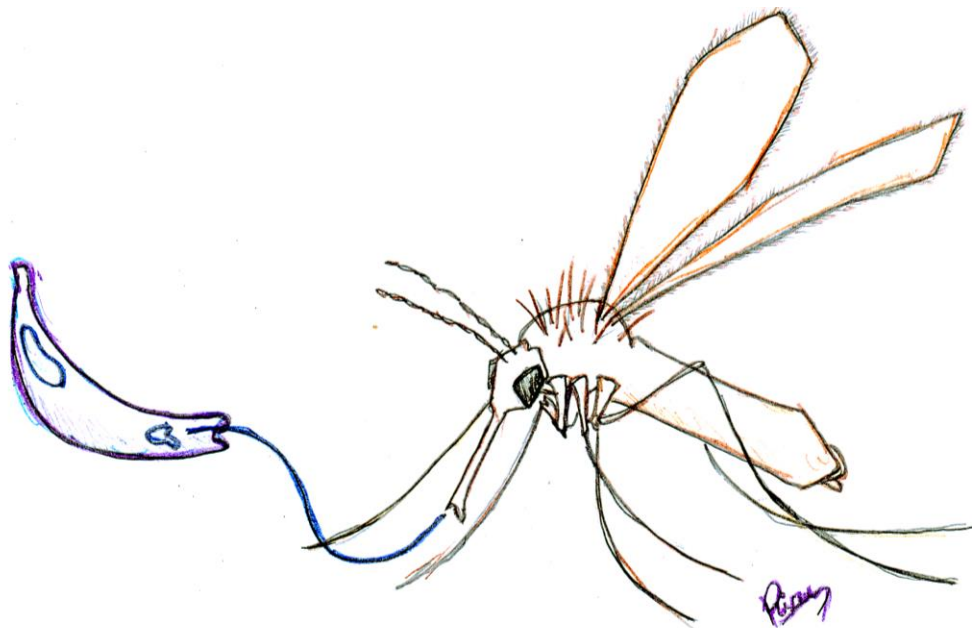
Tabla 15. Estimaciones de un modelo de regresión lineal de efectos aleatorios de la relación entre los valores de LOD contra los antígenos salivales de *P. papatasi* y *P. perniciosus* en perros APR14 (incorporados en el estudio en abril de 2014).

Variable	Nivel	Valor	Error Std.	p-valor
Interceptación		9.16	1.33	
Efectos fijos				
Mes-año	Abril - 2014	0.00		
	Junio	7.69	0.80	<0.0001
	Octubre	9.76	1.02	<0.0001
	Abril - 2015	3.41	1.26	0.0069
	Mayo	9.59	1.30	<0.0001
	Junio	17.61	1.31	<0.0001
	Julio	15.95	1.32	<0.0001
	Agosto	11.73	1.32	<0.0001
	Septiembre	12.30	1.32	<0.0001
	Octubre	12.65	1.32	<0.0001
	Noviembre	12.12	1.32	<0.0001
	Diciembre	9.94	1.33	<0.0001
	Enero- 2016	8.42	1.39	<0.0001
	Febrero	7.45	1.39	<0.0001
	Marzo	9.39	1.38	<0.0001
Abril	10.57	1.31	<0.0001	

Tabla 15. Continuación

Variable	Nivel	Valor	Error Std.	p-valor
Antígeno	<i>P. papatasi</i> rSP32	0.00		
	<i>P. papatasi</i> SGH	-3.80	0.43	<0.0001
	<i>P. perniciosus</i> rSP03B	-6.94	0.43	<0.0001
	<i>P. perniciosus</i> SGH	-5.35	0.43	<0.0001
Edad de los perros (años)	0.5-1.4	0.00		
	1.5-2.4	0.70	0.84	0.5370
	2.5-3.4	-1.01	1.07	0.4387
	>3.4	-3.24	1.72	0.0998
Efectos aleatorios	Varianza			
Perros	17.82			
Meses	<0.01			
Residual	46.68			

DISCUSIÓN



Los trabajos realizados en esta tesis doctoral suponen un avance en el conocimiento de la entomología, epidemiología y control en la Región de Murcia, y una referencia útil para otras zonas de la Cuenca Mediterránea. Se confirma la heterogeneidad espacial en la distribución del vector, estrechamente ligada a características medioambientales específicas, la importancia de la fauna silvestre como reservorio de *L. infantum*, la correlación espacial y temporal de la prevalencia de la infección en zorros, conejos, perros y personas y la abundancia del vector, y finalmente se describe el alcance de los insecticidas para prevenir la infección en el perro, reservorio doméstico de infección. Para facilitar la interpretación de la información generada se ha considerado conveniente estructurar este apartado según los principales trabajos realizados, como se describe a continuación.

1.17. Estudio de la abundancia y distribución de flebotomos en el ámbito rural de la Región de Murcia

En un trabajo reciente en el sur de España, en la provincia de Granada, en el que se investigó la presencia/ausencia de *P. perniciosus*, la probabilidad de encontrar el insecto aumentó con la altitud hasta los 769-1153 m, reflejando la asociación positiva entre su abundancia y la temperatura en este rango de altitud (Baron *et al.*, 2011). De manera similar, la abundancia de *P. perniciosus* fue mínima en las zonas costeras y fue incrementándose hasta alcanzar un máximo a 844-849 m (zona W, nivel de altitud más alto estudiado), excepto en la zona N situada a 536-794 m (zona N) dónde fue menor. Este resultado indica que por sí solos, la altitud o la temperatura no son suficientes para predecir la abundancia de los flebotomos en una zona. La HR, que se asoció negativamente a la abundancia del vector, fue similarmente baja en las zonas N, W y S (265-352 m) lo que indica que tampoco ésta variable es suficiente para explicar las diferencias de abundancia del insecto en estas zonas. Los modelos de abundancia mejoraron mucho al incluir la velocidad máxima del viento, junto a la temperatura y HR, porque la exposición al viento fue más alta y variable en el N y SE (44-83 m). Los

flebotomos tienen una limitada capacidad de vuelo (Alexander, 2000), y el viento fuerte podría dificultar la entrada de éstos en los edificios e incluso generar corrientes dentro de los edificios de animales, haciéndolos poco adecuados como lugares de cría.

El clima fue el responsable de la estacionalidad observada y las marcadas fluctuaciones en la abundancia de flebotomos en corto periodo de tiempo. El gran aumento observado en la segunda semana de Julio coincidió con una "ola de calor" caracterizada por un fuerte aumento de la temperatura y una caída de la humedad relativa y la velocidad del viento. Por lo que sabemos, no se he descrito con anterioridad esta relación con un fenómeno climático tan típico de los veranos mediterráneos. Por otro lado, un estudio en Israel asoció la aparición de un brote de virus del Nilo Occidental transmitido por mosquitos, con una ola de calor estival con temperaturas mínimas altas (Semenza *et al.*, 2009). Branco *et al.* (2013) describió también una elevada densidad de flebotomos en el centro de Portugal asociada a la temperatura media mensual más alta, HR más baja y ausencia de viento fuerte. En Florida en los Estados Unidos, también se observó una relación similar entre temperatura, la RH y la abundancia del flebotomo *Lutzomyia shannoni* (Mann *et al.*, 2010) y en otras regiones mediterráneas, la abundancia de flebotomos se asoció a la ausencia de lluvia y baja HR (Gálvez *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2014; Prudhomme *et al.*, 2015). Si bien los estadios inmaduros de los flebotomos requieren elevada HR para desarrollarse y los adultos son muy sensibles a la desecación (Volf *et al.*, 2011), la baja HR podría favorecer la actividad de éstos últimos durante los breves periodos de actividad en busca de alimento.

La edad de los edificios de los animales donde se colocaron las trampas también se asoció fuertemente con la abundancia de flebotomos, que fue máxima en los más antiguos, y podría indirectamente representar varios factores que afectan la supervivencia del vector. El insecto es muy sensible a los desinfectantes e insecticidas, y éstos no se emplearon frecuencia, excepto en las perreras más modernas. Además, los edificios viejos, con paredes de piedra y abundante acumulación de materia orgánica se consideran ideales para la cría y reposo de los flebotomos. También estaban mal ventilados, y el

dióxido de carbono (CO₂) es un fuerte atrayente de las hembras de los flebotomos que buscan sangre (Alten *et al.*, 2015). Estos resultados son comparables con los obtenidos en Marruecos por Guernaoui y Boumezzoough (2009) donde se asocia una mayor abundancia de *P. perniciosus* con biotopos peridomésticos muy ricos en materia orgánica y bien protegidos (establos de ganado). También se describieron mayores abundancias de flebotomos en zonas urbanas de Turquía donde se encontraban los edificios históricos en ruinas y las grietas de las murallas junto con roedores o pequeños animales domésticos proporcionaban un ambiente favorable para los flebotomos (Dancesco y Chadli, 1982).

A diferencia del clima, el papel del uso de la tierra y los tipos de suelo en la abundancia de flebotomos no está claro. Muchas de esas variables se asociaron con la abundancia en el análisis bivariante, pero en la mayoría de los casos, no se observó una tendencia consistentemente positiva o negativa. Las excepciones fueron la asociación positiva entre la abundancia de flebotomos y el porcentaje de tierra con escasa vegetación y de cultivos de secano, así como de suelo de xerosol petrocálcico y coluvial. Sin embargo, ninguna de estas variables se retuvo en el modelo multivariable final. Esto es comprensible teniendo en cuenta la fuerte correlación entre variables ambientales. La amplia variedad de ambientes en los que *P. perniciosus* es endémico sugiere que su densidad a escala geográfica grande depende más de las condiciones climáticas que de las características específicas y usos de la tierra. Esta conclusión, sin embargo, puede no ser extensible a otras regiones y especies de flebotomos (Colacicco-Mayhugh *et al.*, 2010). Además, los modelos multinivel revelaron una considerable variabilidad entre distintos lugares dentro de la misma zona lo que claramente indica que existen factores del microhábitat no contabilizados en este estudio, que afectan a la densidad de *P. perniciosus*.

La fuerte correlación entre los registros de temperatura y HR interiores (termohigrómetros en los edificios) y exteriores (estaciones meteorológicas) permitieron usar éstos últimos para modelizar la abundancia de flebotomos y permitiría generar y validar mapas de densidad del vector a nivel regional e identificar áreas que requieren un

estudio más detallado. En estudios epidemiológicos previos de Leishmaniosis en la Región de Murcia, la seroprevalencia en perros y la prevalencia de personas PCR-positivas fueron máximas en la zona S, mínima en el N y variable en el SE (Pérez-Cutillas *et al.*, 2015; Goyena *et al.*, 2016). El SE de Murcia abarca la zona costera y es climáticamente variable, lo que podría asociarse a una elevada heterogeneidad en la distribución de flebotomos y Leishmaniosis. En cualquier caso, en Italia se han descrito focos de Leishmaniosis asociados a *P. perniciosus* en zonas costeras (Rossi *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2008). Parece claro que es necesario realizar otros estudios entomológicos y epidemiológicos en la zona SE de Murcia, así como en las zonas C y W donde la información sobre la prevalencia de Leishmania y abundancia de flebotomos es incompleta.

El estudio entomológico se centró principalmente en las capturas de trampas de luz CDC, después de observar que las distribuciones de flebotomos en trampas adhesivas eran similares, pero numéricamente inferiores. *P. perniciosus* fue la especie más abundante en ambos tipos de trampas. Las trampas de luz están especialmente indicadas para capturar especies con elevado fototropismo, como las hembras de *P. perniciosus* (Rossi *et al.*, 2007). Por el contrario, en las trampas adhesivas las capturas son aleatorias reflejando mejor la variedad de especies en un lugar que las trampas de luz (Alexander *et al.*, 2000). *Sergentomyia minuta* se alimenta de reptiles y no es particularmente fototrópica y fue la especie dominante en la mayoría de los estudios en España que utilizaron trampas adhesivas (Gálvez *et al.* 2010). Sin embargo, el número y abundancia relativa de especies identificadas en el presente estudio fue con las trampas de luz fue muy similar al de estudios realizados en el sureste España hace 30 años (Martínez-Ortega, 1985b; Martínez-Ortega *et al.*, 1991). Según señalan estos autores las especies de flebotomos menos frecuentes tienen hábitats preferenciales más estrechos y entre ellas, *P. papatasi*, *P. sergenti* y *P. alexandri* serían más frecuentes en zonas áridas (Martínez-Ortega, 1985b). Si bien con el estudio realizado no es posible llegar a conclusiones definitivas a este respecto, *P. papatasi* fue relativamente más abundante en la zona C más árida y *P. sergenti* en la zona W, menos árida.

A modo de resumen, este estudio confirma la presencia de flebotomos en la CARM, incluidos los dos vectores de *L. infantum* en España, *P. perniciosus* y *P. ariasi*, y proporciona un análisis cuantitativo de su distribución en relación a variables ambientales. Su abundancia es espacial y temporalmente heterogénea, fuertemente dependiente de la temperatura, humedad relativa, lluvia, velocidad del viento y de factores microambientales. Estos hallazgos pueden extrapolarse a otras regiones mediterráneas para mejorar el conocimiento de la dinámica de *P. perniciosus* y de la infección por *L. infantum*. Además, los métodos de muestreo y análisis utilizados en este estudio pueden ser un modelo para realizar estudios similares en otras zonas lo que facilitaría la comparación entre distintas zonas geográficas.

1.18. Estudio de la prevalencia de *L. infantum* en fauna silvestre en el sureste de España

Se detectó la infección por *L. infantum* en zorros, conejos, ratones de campo, garduñas, gatos monteses, lobos y jineta, lo que demuestra que el parásito está presente en una proporción considerable de la fauna autóctona del sureste de España. No obstante, se observaron diferencias significativas en la prevalencia de la infección entre las especies, las zonas geográficas y la época del año en que se tomaron las muestras de los animales. También se observaron diferencias con respecto a la localización de la infección, en la piel y en los órganos.

Todas las especies con resultados PCR-positivos a *L. infantum* se habían descrito con anterioridad infectadas o positivas mediante técnicas moleculares (Quinell y Courtenay, 2009; Millán *et al.*, 2014; Navea-Pérez *et al.*, 2015). Con excepción de algunos zorros, conejos y ratones, los valores de Ct de las PCR positivas fueron altos, lo que indica que la carga parasitaria fue baja. Esto es típico de la fauna silvestre y posiblemente es consecuencia de la presión evolutiva que ha facilitado la selección de animales capaces de desarrollar una respuesta inmunológica eficaz frente al parásito (Tsakmakidis *et al.*, 2017; Tomassone *et al.*, 2018). Además, la infección en la mayoría de los conejos se limitó a la

piel como se ha visto en otros estudios (García *et al.*, 2014; Ortega *et al.*, 2017), mientras que en zorros se encontró principalmente en órganos y no en la piel. En perros con infecciones subclínicas, el ADN del parásito se detecta tanto en piel como en órganos (Chitimia *et al.*, 2011). La visceralización del parásito y el posterior desarrollo de la enfermedad en perros y humanos está regulada por la respuesta inmunológica del hospedador (Baneth *et al.*, 2008; McCall, 2013). Ni los conejos ni los zorros en este estudio mostraron lesiones compatibles con *Leishmania* y las diferencias entre ellos respecto a la ubicación predominante del parásito podría ser consecuencia de diferencias en la respuesta inmunológica o de las cepas de *L. infantum* presentes en una y otra especie. El tropismo tisular preferencial del parásito también tiene importantes implicaciones diagnósticas en estudios epidemiológicos de la parasitosis en zorros y conejos.

La prevalencia de *L. infantum* en la CARM, particularmente en zorros, fue máxima en las zonas S y W, intermedia en la N y C y mínima en el SE, coincidiendo exactamente con la abundancia del vector *P. perniciosus* en las zonas rurales de la RM, descrita anteriormente. Estos resultados sugieren una correlación positiva entre la densidad del vector y la prevalencia de *L. infantum*, y por lo tanto que la vigilancia entomológica puede ser un indicador útil del riesgo de infección (Antonioni *et al.*, 2013). Sin embargo, los flebotomos pueden alimentarse de una amplia variedad de hospedadores con baja susceptibilidad a la infección por *L. infantum* (Rossi *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2013; Cotteaux-Lautard *et al.*, 2016), lo que podría llevar a una situación de elevada densidad del vector, pero con una tasa de infección escasa o nula. Por ello, para evaluar el riesgo de infección en una zona, además de la densidad de vectores es necesario considerar otros factores como la tasa de infección del vector y la densidad del hospedador con elevada susceptibilidad a *L. infantum*.

La seroprevalencia de LCan y la prevalencia LHum analizada por PCR en individuos asintomáticos de la CARM en estudios anteriores, fue también espacialmente heterogénea y mayor en la zona S, lo que sugiere que se trata de una zona de alto riesgo de *L. infantum* (Pérez-Cutillas *et al.*, 2015; Goyena *et al.*, 2016). La correlación entre la

prevalencia de infección de *L. infantum* en fauna silvestre, perros y humanos en otras zonas de la CARM fue menor, probablemente debido a la variabilidad en la densidad de vector y de infección a escala geográfica a pequeña. Aun teniendo en cuenta estas consideraciones, se podría concluir que globalmente, la prevalencia de *L. infantum* y la abundancia de vectores en la CARM es máxima en áreas situadas a 200 metros o más sobre el nivel del mar, con HR% y precipitaciones comparativamente bajas, temperaturas en primavera-verano moderadamente elevadas y con bajas velocidades máximas de viento (Pérez-Cutillas *et al.*, 2015; Goyena *et al.*, 2016).

Se observó una cierta estacionalidad en la prevalencia de *L. infantum* en zorros siendo menor en la primavera que en otras estaciones. En un estudio anterior, la prevalencia de perros PCR-positivos en la CARM fue también menor en primavera comparado con el otoño (Chitimia *et al.*, 2011). El periodo de actividad de *P. perniciosus* en la CARM es de octubre a noviembre (Martínez-Ortega *et al.*, 1987) y las tasas de infección en el vector estudiadas en otras partes de España, fueron máximas al final del periodo de actividad (González *et al.*, 2017b). Podría pensarse que algunos hospedadores que se infectan en verano y otoño son capaces de eliminar el parásito completamente durante el invierno cuando no están sujetos a reinfecciones, y serían PCR-negativos en primavera antes del comienzo de un nuevo periodo de transmisión.

La correlación espacio-temporal entre la prevalencia de *L. infantum* en fauna silvestre, perros y humanos, y la abundancia de vectores no implica necesariamente que los ciclos de transmisión del parásito domésticos y selváticos interactúen entre sí. En este sentido, el análisis genético comparativo de las cepas de *L. infantum* en los distintos hospedadores es una herramienta útil. Los análisis de RFLP del ADN del kinetoplasto de las cepas de los zorros del presente estudio realizados por Ortuño *et al.*, (2017), revelaron el genotipo B, que es también el más abundante en perros y humanos de la CARM (Ortuño *et al.*, 2017) y en Marruecos (El-Hamouchi *et al.*, 2017) y el segundo más frecuente en Portugal (Cortes *et al.*, 2006). Este resultado sugiere que existe una conexión entre los ciclos de transmisión de *L. infantum* doméstico y selvático en la CARM.

El potencial de la vida silvestre para mantener la endemicidad de la infección por *L. infantum* en ausencia de perros es un tema de debate (Tomassone *et al.*, 2018). Un estudio reciente en la isla de Montecristo en Italia donde no hay perros, describió infección natural en roedores silvestres (Zanet *et al.*, 2014), y los experimentos de xenodiagnóstico han demostrado que varias especies, incluidos roedores, zorros y lagomorfos, pueden transmitir fácilmente el parásito al vector, indicando su potencial para ser reservorios primarios de infección (Quinell y Courtenay, 2009; Molina *et al.*, 2012b; Jiménez *et al.*, 2014). Desde un punto de vista ecológico, son varios los factores que sugieren que los zorros y los conejos son reservorios adecuados de *L. infantum*. Ambas especies habitan en madrigueras que son lugares ideales para la cría y reposo de los flebotomos. Los conejos son una especie de presa clave para la mayoría de los depredadores del Mediterráneo, incluido el zorro (Cavallini y Volpi, 1996; Ferreras *et al.*, 2011). En el sudeste de España los estudios de Martínez-Carrasco *et al.* (2007) mostraron que los zorros viven en contacto cercano con conejos, compartiendo el mismo hábitat. Además, los zorros se han adaptado bien a ambientes antrópicos y tienen un ciclo diario diurno-nocturno que coincide con la actividad vectorial (López-Martín, 2010; Cancio *et al.*, 2017). Además, el oportunismo y capacidad de rastrear los alimentos desechados por humanos y animales domésticos son un rasgo característico del zorro. Ello facilitaría su contacto con vectores del entorno doméstico, lo que afectaría a la dinámica de transmisión de *L. infantum*, constituyendo un reto más de cara al control de la Leishmaniosis en los países mediterráneos.

1.19. Estudio longitudinal de anticuerpos frente a la saliva de los flebotomos en perros tratados con insecticida

En el estudio realizado la mayoría de los perros expuestos de forma natural a *P. perniciosus* y *P. papatasi* desarrollaron anticuerpos frente a la saliva de estos insectos, a pesar de estar tratados correctamente con el insecticida tópico Advantix (Bayer®), específicamente indicado para prevenir la LCan. Estos resultados concuerdan con los de

los estudios experimentales que indican que la eficacia de los productos repelentes es de alrededor del 90% cuando se aplica cada 3 semanas (Mencke *et al.*, 2003; Miró *et al.*, 2007a). El mayor porcentaje de seropositivos y las densidades ópticas (DO) más elevadas de anticuerpos en los perros del grupo APR14 que en los de JUN14 y MAR15, sería consecuencia de la duración del periodo de exposición que fue 2 temporadas en el primer caso y 1,5 y 1, respectivamente, en los otros grupos.

Al no haberse utilizado un grupo control de animales no tratados, no fue posible evaluar cuantitativamente la eficacia en la protección del producto. Sin embargo, fueron relativamente pocos los perros que seroconvirtieron a las proteínas recombinantes de ambos flebotomos y al SGH de *P. papatasi* a pesar de la larga exposición. En un estudio anterior de dos años en el sur de Italia, se encontraron niveles mucho más altos de anticuerpos contra *P. perniciosus* SGH y la proteína rSP03B en perros no tratados (Kostalova *et al.*, 2015). Estos hallazgos y el hecho de que ningún perro se infectara durante el primer año, antes de la infección experimental, sugieren que el tratamiento preventivo fue efectivo.

El mayor porcentaje de muestras seropositivas a *P. perniciosus* SGH en comparación con otros antígenos podría reflejar una alta exposición de los perros a *P. perniciosus* o alternativamente, que el valor de corte utilizado en el ELISA para esta prueba fue demasiado bajo. La especie *P. perniciosus* representó un 26% de las hembras capturadas en la zona y es bien sabido que *P. perniciosus* es una especie con gran atracción hacia los cánidos (Bongiorno *et al.*, 2003). Los puntos de corte elegidos se basaron en los niveles más altos de anticuerpos antes de la exposición y el del SGH de *P. perniciosus* fue proporcionalmente menor que el de los otros antígenos, lo que cabe esperar que resulte en una mayor seroprevalencia (Greiner y Gardner, 2000).

La respuesta humoral a las proteínas salivales de los flebotomos suele ser específica, aunque se han descrito reacciones cruzadas entre especies taxonómicamente cercanas, aunque no entre *P. perniciosus* y *P. papatasi*, que pertenecen a subgéneros distantes (Volf

y Rohousova, 2001). De manera similar, se demostró una leve reactividad cruzada entre *P. papatasi* y *P. sergenti* (Rohousova *et al.*, 2005; Martín-Martín *et al.*, 2014). Es importante señalar que, en un estudio anterior, los sueros de perros expuestos a *P. perniciosus* no mostraron reactividad cruzada con la proteína rSP32 o el extracto de glándula salival de *P. papatasi* (Marzouki *et al.*, 2015).

El estudio confirma la utilidad de la proteína recombinante rSP03B de *P. perniciosus* como un buen marcador para estimar la exposición de los perros a esta especie. La correlación entre los anticuerpos frente a rSP03B y a SGH de *P. perniciosus* fue alta, coincidiendo con resultados de otros estudios (Drahota *et al.*, 2014; Kostalova *et al.* 2015, Kostalova *et al.*, 2017). Por otra parte, destacar que en el presente estudio fue la primera vez que se evaluó el comportamiento de la proteína recombinante rSP32 de *P. papatasi* para detectar anticuerpos frente a la saliva de esta especie en perros. Las DOs del ELISA fueron significativamente mayores que para el SGH de *P. papatasi*, pero ambos mostraron una estacionalidad similar. La correlación entre rSP32 y el SGH de *P. papatasi* fue moderada y menor que en un estudio grande con sueros humanos de Túnez (Marzouki *et al.*, 2015). Se sabe que las respuestas humorales frente a proteínas salivares varían según la especie hospedadora (Lestanova *et al.*, 2017); en el SGH de *P. papatasi*, los sueros humanos reconocieron sobre todo una proteína de 30 kDa, mientras que en los sueros de ratón la banda predominante fue la de proteínas de 42 kDa (Rohoušova *et al.* 2005). El antígeno rSP32 se seleccionó originalmente utilizando sueros humanos (Marzouki *et al.*, 2012), pero el análisis de WB con sueros caninos mostró una reacción positiva y reveló varias bandas teñidas con pesos moleculares ligeramente diferentes. Todas estas bandas estarían relacionadas con la proteína SP32 de *P. papatasi*, correspondiendo posiblemente a diferentes conformaciones de la proteína (Marzouki *et al.*, 2012). En base a estos resultados, se puede considerar que la proteína recombinante rSP32 es un candidato adecuado para la valorar la exposición a *P. papatasi* en perros expuestos a esta especie de manera natural.

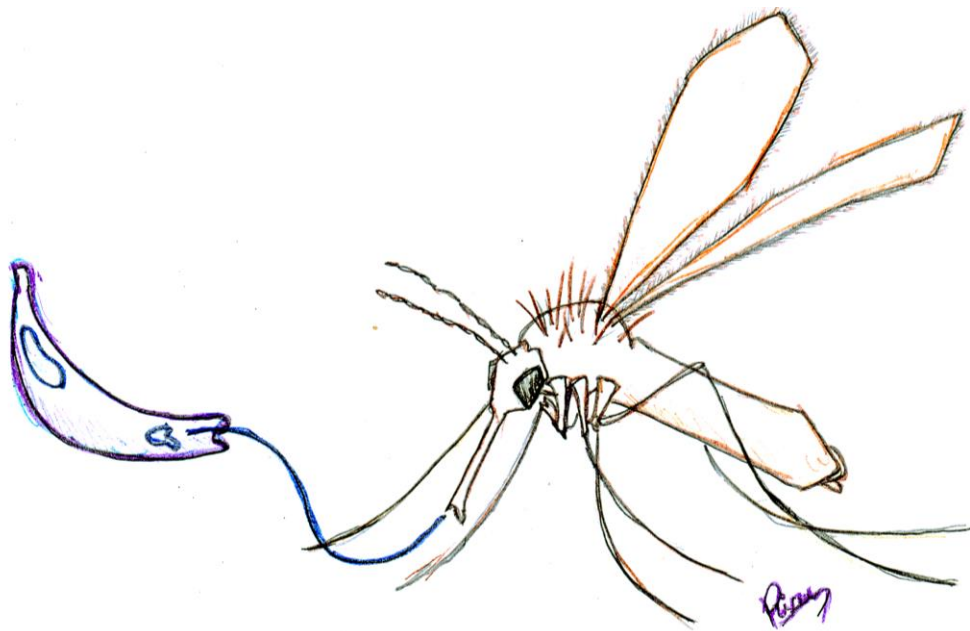
La distribución temporal de los anticuerpos frente a la saliva de los flebotomos del presente estudio es similar a la descrita en el trabajo de Kostalova *et al.* en perros en Italia (2015). En ambos casos destaca la marcada estacionalidad que es paralela a la abundancia de flebotomos con un pico temprano en junio-julio y otro en septiembre, coincidente también con el patrón descrito 30 años atrás por Martínez-Ortega *et al.* (1987). Esto sugiere que a mayor número de picaduras mayor es la producción de anticuerpos. Sin embargo, se observaron diferencias en la respuesta humoral entre el primer y el segundo año de exposición. Los anticuerpos desarrollados durante la primera temporada de flebotomos en 2014 cayeron a niveles casi de pre-exposición en el invierno de 2014-15, indicando que la respuesta IgG dura menos de 12 meses. Este mismo efecto lo observó Quinnell *et al.* (2018) en perros expuestos a flebotomos de forma natural y Hostomska *et al.* (2008) y Vlkova *et al.* (2011) experimentalmente. Tras la re-exposición a los flebotomos en el verano de 2015, los niveles de IgG aumentaron rápidamente hasta casi el doble de los del verano 2014 y aunque disminuyeron durante el invierno de 2015-16, las DOs se mantuvieron comparativamente más altas que el invierno de 2014-15. Este fenómeno es compatible con la producción de IgG específica y duradera por parte de linfocitos de memoria y células plasmáticas tras la re-exposición a los antígenos salivales. Es poco probable que la infección experimental de los perros en 2015 afectara a la respuesta humoral ya que la DO de anticuerpos en el grupo APR14 en 2014 (primer año de exposición en este grupo) y en la de MAR15 (primer año de exposición en este grupo) fueron similares.

Las razones de la variabilidad en los niveles de anticuerpos entre perros de los mismos grupos de exposición no obedecen una causa evidente. Kostalova *et al.* (2015) describió un fenómeno similar. Se ha visto que no todos los perros de un grupo expuesto a flebotomos tienen la misma probabilidad de ser picados, que los flebotomos tienen preferencias por algunos perros (Bongiorno *et al.*, 2013). También podría estar relacionado con diferencias entre perros en su tendencia a producir una respuesta humoral a los antígenos salivales de los flebotomos. La respuesta de anticuerpos de

ratones picados por *P. perniciosus* en condiciones experimentales varió significativamente entre individuos, particularmente con respecto a la producción de IgG2, típicamente asociada con una respuesta inmunológica celular Th1 (Martín-Martín *et al.*, 2015). La respuesta inmunológica del perro a *L. infantum* también está típicamente sesgada hacia una respuesta predominantemente celular o humoral dependiendo de la genética de animal (Baneth *et al.*, 2008). Finalmente, se observó una asociación negativa entre los niveles de anticuerpos y la edad del perro; se podría especular que los flebotomos tienen mayor atracción por perros más jóvenes o que hay diferencias de edad con respecto a la respuesta humoral a las picaduras de flebotomo.

En resumen, el estudio indica que los perros tratados preventivamente con pipetas Advantix (Bayer®) y expuestos naturalmente a *P. perniciosus* y *P. papatasi* desarrollan anticuerpos específicos contra las proteínas salivales del insecto y que los anticuerpos de los perros en la CARM siguen un patrón estacional típico de los flebotomos locales, con picos en junio-julio y septiembre-octubre. Sin embargo, el porcentaje relativamente bajo de perros seropositivos en las pruebas de proteínas recombinantes específicas de *P. perniciosus* y *P. papatasi* sugiere que el tratamiento evitó en gran medida las picaduras de flebotomo, lo que confirma la utilidad de los productos para la prevención de CanL.

CONCLUSIONES



Primera

La variedad de especies de flebotomos de la CARM incluye al menos 8 especies de flebotomos (Diptera: Psychodidae) entre las que destaca por ser el más abundante *Phlebotomus perniciosus*, el principal vector de *Leishmania infantum* en la Península ibérica, además de *P. ariasi*, *P. longicuspis*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, *P. ariasi*, *P. alexandri* y *Sergentomyia minuta*.

Segunda

El vector abunda en el ámbito rural en colectivos de animales. Sin embargo, su abundancia es estacional y espacialmente heterogénea dependiendo a escala geográfica grande de la temperatura, la humedad relativa y velocidad del viento, y localmente de factores microambientales como el manejo y las características de los edificios de los animales.

Tercera

La infección por *L. infantum* es endémica en carnívoros, lagomorfos y roedores silvestres de la CARM, constatándose una elevada prevalencia en zorros (*Vulpes vulpes*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*).

Cuarta

L. infantum tiene un tropismo preferencial por la piel en los conejos y los órganos en los zorros y esto debe de tenerse en cuenta de cara a maximizar la sensibilidad del diagnóstico de la infección.

Quinta

La distribución espacial y temporal de la Leishmaniosis en zorros y conejos es heterogénea y se relaciona con la abundancia del vector y la prevalencia de infección en perros y humanos.

Sexta

El hecho de que la prevalencia de leishmaniosis en fauna silvestre, perros y humanos coincida espacialmente y de que compartan una cepa de *L. infantum* con el mismo genotipo sugiere que comparten un ciclo de transmisión del parásito.

Séptima

Para mejorar las estrategias de control de la leishmaniosis es importante tener en cuenta la heterogeneidad en la distribución espacial y temporal del vector y la Leishmaniosis y la presencia de infección en la fauna silvestre.

Octava

El insecticida tópico Advantix (Bayer®) no evita completamente las picaduras de los flebotomos *P. perniciosus* y *P. papatasi* en perros expuestos naturalmente, aunque probablemente reduce el riesgo de padecerlas y de infección con *L. infantum* y por tanto su empleo es útil en el control de esta parasitosis.

Novena

La proteína recombinante rSP32 (Genbank ac. JX411944) es un antígeno válido para evaluar la exposición del perro a *P. papatasi*.

CONCLUSIONS

First

At least eight sandfly (Diptera: Psychodidae) species are present in Murcia Region among which the most abundant is *Phlebotomus perniciosus*, the main vector of *Leishmania infantum* in the Iberian Peninsula, and other species included *P. ariasi*, *P. longicuspis*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, *P. ariasi*, *P. alexandri* and *Sergentomyia minuta*.

Second

Vector abundance is high in rural areas specifically in farm animal enclosures. However, its seasonal and spatially heterogeneous depending on large geographical scale, on temperature, relative humidity and wind speed, and locally on micro environmental factors such as animal husbandry practices and buildings characteristics.

Third

L. infantum infection is widespread in carnivores, lagomorphs and wild rodents in the Region of Murcia, and its particularly high in in foxes (*Vulpes vulpes*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).

Fourth

L. infantum has preferential tropism for the rabbit's skin and red fox's organs and this must be taken into account to maximize diagnostic sensitivity.

Fifth

The spatial and temporal Leishmaniosis distribution in red foxes and rabbits is heterogeneous and related to vector abundance and the prevalence of *L. infantum* infection in dogs and humans.

Sixth

The fact that prevalence. *Infantum* prevalence in wildlife, dogs and humans coincide spatially and share the same strain genotype suggest a common parasite transmission cycle.

Seventh

To improve Leishmaniosis control strategies, it is important to take into account the spatial and temporal heterogeneity in vector distribution and Leishmaniosis, in addition to the presence of infection in wildlife.

Eighth

The topical insecticide Advantix (Bayer®) commercialised to prevent *L. infantum* infection does not completely avoid *P. perniciosus* and *P. papatasi* bites in naturally exposed dogs, although it probably reduces biting rate and the risk of *L. infantum* infection and therefore it is useful in the control of this parasitosis.

Ninth

The *P. papatasi* rSP32 recombinant protein (Genbank ac. JX411944) could serve as a valid universal marker of exposure to this insect.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Badei, N. M., Khater, E. I., Daba, S., Shehata, M. G. (2012). Morphometrics and protein profiles of the salivary glands of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* sand flies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(4), 235-242.

Abdel-Hamid, Y. M. (2012). Life table characteristics of the female sandfly, *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae) under three food regimes. *Journal of vector borne diseases*, 49(4), 226.

Abonnenc, E. (1972). Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). *Cahiers de l'ORSTOM, série Entomologie médicale et Parasitologie*, 55, 1-239.

Abranches, P., Conceição-Silva, F. M., Silva-Pereira, M. C. (1984). Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *The Journal of tropical medicine and hygiene*, 87(5), 197-200.

Abranches, P., Silva-Pereira, M. C. D., Conceição-Silva, F. M., Santos-Gomes, G. M., Janz, J. G. (1991). Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *The Journal of parasitology*, 557-561.

Abranches, P., Lopes, F. J., Silva, F. M. C., Ribeiro, M. M. S., Pires, C. A. (1983) Le Kala-azar au Portugal. III. Résultats d'une enquête sur la leishmaniose canine réalisée dans les environs de Lisbonne. Comparaison des zones urbaines et rurales. *Annls Parasit. hum. comp.* 58, 307–315.

Adler, S., Theodor, O. (1926). The mouthparts, alimentary tract, and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 20, 109-142.

Adler, S., Theodor, O. (1957). Transmission of disease agents by phlebotomine sand flies. *Annual Review of Entomology*, 2(1), 203-226.

Agrela, I. F., Feliciangeli, M. D. (2015). Effect of *Leishmania* spp infection on the survival, life expectancy, fecundity and fertility of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia pseudolongipalpis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(5), 611-617.

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349.

Alcolea, P. J., Alonso, A., Degayón, M. A., Moreno-Paz, M., Jiménez, M., Molina, R., Larraga, V. (2016). In vitro infectivity and differential gene expression of *Leishmania*

infantum metacyclic promastigotes: negative selection with peanut agglutinin in culture versus isolation from the stomodeal valve of *Phlebotomus perniciosus*. *BMC genomics*, 17(1), 375.

Alcover, M. M., Ballart, C., Martín-Sánchez, J., Serra, T., Castillejo, S., Portús, M., Gállego, M. (2014). Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. *Parasites & vectors*, 7(1), 421.

Alexander, B. (2000). Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(2), 109-122.

Alkan, C., Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E. A., Charrel, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral research*, 100(1), 54-74.

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 leishmaniasis in an endemic Mediterranean area. *Zoonoses and public health*, 57(5), 318-328.

Al-Salem, W. S., Pigott, D. M., Subramaniam, K., Haines, L. R., Kelly-Hope, L., Molyneux, D. H., Acosta-Serrano, A. (2016). Cutaneous leishmaniasis and conflict in Syria. *Emerging infectious diseases*, 22(5), 931.

Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A.L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbel, Y., Arserim, S.K., Erisoz Kasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsvadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L. (2016). Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2), e0004458.

Alten, B., Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O.E., Cull, B., Antoniou, M., Velo, E., Prudhomme, J., Molina, R., Bañuls, A.-L. (2015). Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bulletin of entomological research*, 105(6), 664-678.

Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Moreno, J. (1997). Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical microbiology reviews*, 10(2), 298-319.

- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*, 57(3), 1-88.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one*, 7(5), e35671.
- Amela, C., Mendez, I., Torcal, J. M., Medina, G., Pachon, I., Canavate, C., Alvar, J. (1995). Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European journal of epidemiology*, 11(2), 157-161.
- Amela, C., Suarez, B., Isidoro, B., Sierra, M. J., Santos, S., y Simón, F. (2012). Informe de situación. Riesgo de transmisión de *L. infantum* en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). *Revista Española de Salud Pública*, 86, 555-564.
- Amusatogui, I., Sainz, A., Aguirre, E., Tesouro, M. A. (2004). Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), 154-157.
- Anderson, J. M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B. J., Reynoso, D., Seitz, A. E., Valenzuela, J. G. (2006). Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC genomics*, 7(1), 52.
- Andrade, B. D. B., De Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral, A., Barral-Netto, M. (2007). Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scandinavian journal of immunology*, 66(2-3), 122-127.
- Andrade-Filho, J. D., Oliveira, R. C. D., Fonseca, A. R. (2008). Sandflies (Diptera: Psychodidae) collected with Malaise trap in the center-west of Minas Gerais state, Brazil. *Neotropical entomology*, 37(1), 104-106.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P. (2013). The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Eurosurveillance*, 18(30), 20540.
- Aransay, A. M., Testa, J. M., Morillas-Marquez, F., Lucientes, J., Ready, P. D. (2004). Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitology research*, 94(6), 416-420.
- Arce, A., Estirado, A., Ordoñas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, M. A., Villas, F., Bernal, J., Iriso, A. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Eurosurveillance*, 18(30), 20546.

Ashford, R. W. (1991). A new morphological character to distinguish *Sergentomyia* and *Phlebotomus*. *Parassitologia*, 33, 79-83.

Ashford, R. W., Bettini, S. (1987). The leishmaniasis in biology and medicine. *Ecology and epidemiology: Old World*, W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds.). Academic Press, London, UK, 365-424.

Aslan, H., Oliveira, F., Meneses, C., Castrovinci, P., Gomes, R., Teixeira, C., Derenge, C.A., Orandle, M., Gradoni, L., Oliva, G. (2016). New insights into the transmissibility of *Leishmania infantum* from dogs to sand flies: experimental vector-transmission reveals persistent parasite depots at bite sites. *The Journal of infectious diseases*, 213(11), 1752-1761.

Aspöck, H., Gerersdorfer, T., Formayer, H., Walochnik, J. (2008). Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 120(4), 24-29.

Ayhan, N., Baklouti, A., Prudhomme, J., Walder, G., Amaro, F., Alten, B., Huemer, H. (2017). Practical Guidelines for studies on sandfly-borne phleboviruses: Part I: important points to consider ante field work. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1), 73-80.

Badakhshan, M., Yaghoobi-Ershadi, M. R., Moin-Vaziri, V., Charrel, R., Hanafi-Bojd, A. A., Rezaei, F., Oshaghi, M. A. (2018). Spatial Distribution of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) as Phlebovirus Vectors in Different Areas of Iran. *Journal of medical entomology*, 1-9.

Bahia, D., Gontijo, N. F., León, I. R., Perales, J., Pereira, M. H., Oliveira, G., Reis, A. B. (2007). Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology research*, 100(3), 449-454.

Ballart, C., Barón, S., Alcover, M. M., Portús, M., Gállego, M. (2012). Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta tropica*, 122(1), 155-159.

Ballart, C., Guerrero, I., Castells, X., Barón, S., Castillejo, S., Alcover, M.M., Portús, M., Gállego, M. (2014). Importance of individual analysis of environmental and climatic factors affecting the density of *Leishmania* vectors living in the same geographical area: the example of *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus* in northeast Spain. *Geospatial health*, 8(2), 389-403.

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 in parasitology*, 24(7), 324-330.

Barbiéri, C. L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite immunology*, 28(7), 329-337.

Bari, A. U., Rahman, S. B. (2008). Many faces of cutaneous leishmaniasis. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 74(1), 23.

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(10), 1234-1244.

Barón, S., Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Morales-Yuste, M., Boussaa, S., Morillas-Márquez, F. (2008). Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta tropica*, 107(3), 259-267.

Basimike, M., Mutinga, M. J. (1995). Effects of permethrin-treated screens on phlebotomine sand flies, with reference to *Phlebotomus martini* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 32(4), 428-432.

Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, 37(10), 1097-1106.

Bates, P. A., Rogers, M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current molecular medicine*, 4(6), 601-609.

Belén, A., Alten, B. (2011). Seasonal dynamics and altitudinal distributions of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Cukurova region of Turkey. *Journal of Vector Ecology*, 36(s1).

Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Sacks, D. L. (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine*, 188(10), 1941-1953.

Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., Sacks, D. (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *The Journal of Immunology*, 165(2), 969-977.

Benabdennbi, I., Bombard, S., Braverman, Y., Pesson, B. (1996). Differentiation of females in *Sergentomyia* sensu stricto (Diptera: Psychodidae) using scanning electron microscopy of pharyngeal armatures. *Journal of medical entomology*, 33(2), 265-268.

Berdjane-Brouk, Z., Koné, A. K., Djimdé, A. A., Charrel, R. N., Ravel, C., Delaunay, P., Depaquit, J., Thera, M. A. (2012). First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia* (*Spelaemyia*) darlingi from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *PloS one*, 7(1), e28266.

Berenguer, J. G., Botet, J., Vynieta, M. P., Gállego, M. (1992). Los flebótomos de la España peninsular e Islas Baleares: identificación y corología: comentarios sobre los métodos de captura. In *In memoriam al profesor doctor D. Francisco de Paula Martínez Gómez* (pp. 579-600). Servicio de Publicaciones.

Bettini, S., Gradoni, L., Pozio, E. (1978). Isolation of *Leishmania* strains from *Rattus rattus* in Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4), 441-442.

Bettini, S., Pozio, E., Gradoni, L. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy):(II) *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(1), 77-83.

Blázquez, A., García-Alonso, M., Miñana, O., Navarrete, I., Molano, I., Rosado, D., Gómez-Nieto, C. (1999). La leishmaniosis canina en Plasencia: Sobre los vectores del parásito y la seroprevalencia canina. *Macracantorrinco*, 12-18.

Bliese, P. (2013). Multilevel modeling in R (2.5). See http://cran.r-project.org/doc/contrib//Bliese_Multilevel.Pdf

Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., Maroli, M. (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta tropica*, 88(2), 109-116.

Borja-Cabrera, G. P., Pontes, N. C., Da Silva, V. O., De Souza, E. P., Santos, W. R., Gomes, E. M., de Sousa, C. P. (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20(27-28), 3277-3284.

Boucekoua, M., Trabelsi, S., Abdallah, T. B., Khaled, S. (2014). Visceral leishmaniasis after kidney transplantation: report of a new case and a review of the literature. *Transplantation reviews*, 28(1), 32-35.

Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T., Chabanne, L. (1997). Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 59(1-2), 21-30.

Boussaa, S., Boumezzough, A., Remy, P. E., Glasser, N., Pesson, B. (2008). Morphological and isoenzymatic differentiation of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in Southern Morocco. *Acta tropica*, 106(3), 184-189.

Boussaa, 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 tropica*, 95(2), 86-91.

Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristovão, J. M. S., Gonçalves, L., Afonso, M. O. (2013). Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta tropica*, 125(3), 339-348.

Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Afonso, M.O., Frontera, E., Campino, L., Pérez-Martín, J.E., Aguilera, F.J.S., Reina, D. (2016). First molecular detection of *Leishmania tarentolae*-like DNA in *Sergentomyia minuta* in Spain. *Parasitology research*, 115(3), 1339-1344.

Bravo-Barriga, D. (2017). Entomofauna de culicidae y phlebotominae en Extremadura, España: detección molecular de parásitos asociados (*Dirofilaria* spp. y *Leishmania* spp.). *Tesis Doctoral*, Universidad de Extremadura, España.

Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Falsone, L., Prudente, C., Basano, F. S., Stanneck, D. (2014). Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, 7(1), 327.

Calle, A. I., Marí, R. B., de las Heras, E., Lucientes, J., Molina, R. (2017). Cambio climático en España y su influencia en las enfermedades de transmisión vectorial. *Revista de Salud Ambiental*, 17(1), 70-86.

Campbell-Lendrum, D. H., Pinto, M. C., Brandão-Filho, S. P., De Souza, A. A., Ready, P. D., Davies, C. R. (1999). Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 13(3), 299-309.

Campino, L., Cortes, S., Dionísio, L., Neto, L., Afonso, M. O., Maia, C. (2013). The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 516-518.

Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J. A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Dedet, J. P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine & International Health*, 11(11), 1708-1714.

Cancio, I., González-Robles, A., Bastida, J. M., Isla, J., Manzaneda, A. J., Salido, T., Rey, P. J. (2017). Landscape degradation affects red fox (*Vulpes vulpes*) diet and its ecosystem

services in the threatened *Ziziphus lotus* scrubland habitats of semiarid Spain. *Journal of Arid Environments*, 145, 24-34.

Carcelen, J., Iniesta, V., Fernandez-Cotrina, J., Serrano, F., Parejo, J. C., Corraliza, I., Gomez-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(43), 5964-5973.

Cardoso, L.s., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejão, E., van Benthem, B., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Semião-Santos, S.J. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary parasitology*, 121(1-2), 21-32.

Carvalho, A. M., Cristal, J. R., Muniz, A. C., Carvalho, L. P., Gomes, R., Miranda, J. C., de Oliveira, C. I. (2015). Interleukin 10–Dominant Immune Response and Increased Risk of Cutaneous Leishmaniasis After Natural Exposure to *Lutzomyia intermedia* Sand Flies. *The Journal of infectious diseases*, 212(1), 157-165.

Casanova, C. (2001). A soil emergence trap for collections of phlebotomine sand flies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(2), 273-275.

Cavaliero, T., Arnold, P., Mathis, A., Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Deplazes, P. (1999). Clinical, Serologic, and Parasitologic Follow-Up after Long-Term Allopurinol Therapy of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Journal of veterinary internal medicine*, 13(4), 330-334.

Cavallini, P., & Volpi, T. (1996). Variation in the diet of the red fox in a Mediterranean area. *Rev. Eco/. (Terre Vie)* 51, 174-189

Černá, P., Mikeš, L., Volf, P. (2002). Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(12), 1691-1697.

Chagas, A. C., Oliveira, F., Debrabant, A., Valenzuela, J. G., Ribeiro, J. M., Calvo, E. (2014). Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits X1a contact activation in human plasma. *PLoS pathogens*, 10(2), e1003923.

Chamizo, C., Moreno, J., Alvar, J. (2005). Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 103(1-2), 67-75.

Champagne, D. E., Ribeiro, J. M. (1994). Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 138-142.

Chaniotis, B. N., Correa, M. A., Tesh, R. B., Johnson, K. M. (1974). Horizontal and vertical movements of phlebotomine sandflies in a Panamanian rain forest. *Journal of medical entomology*, 11(3), 369-375.

Charlab, R., Valenzuela, J. G., Rowton, E. D., Ribeiro, J. M. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15155-15160.

Chelbi, I., Zhioua, E. (2007). Biology of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *Journal of medical entomology*, 44(4), 597-600.

Chicharro, C., Jimenez, M. I., Alvar, J. (2003). Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(sup1), 57-64.

Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I. P., García, E., Nieto, J., Moreno, J., Cruz, I. (2013). Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Eurosurveillance*, 18(30), 20545.

Chitimia, L., Muñoz-García, C., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., Del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P. (2011). Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Veterinary parasitology*, 181(1), 12-16.

Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary record*, 141, 539-543.

Claborn, D.M., (2010). The biology and control of leishmaniasis vectors. *Journal of Global Infectious Diseases* 2, 127-134.

Clements, M.F., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomska, J., Dinesh, D.S., Kumar, V., Das, P., Muller, I., Hamilton, G., Volfova, V., Boelaert, M., Das, M., Rijal, S., Picado, A., Volf, P., Sundar, S., Davies, C.R., Rogers, M.E. (2010). Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(5), 801-807.

- Colacicco-Mayhugh, M. G., Masuoka, P. M., Grieco, J. P. (2010). Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Middle East. *International journal of health geographics*, 9(1), 2.
- Collado, J. G., Márquez, F. M., Marín, M. S. (1989). Los flebotomos en España. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, 63, 15-34.
- Collantes, F., Martínez-Ortega, E. (1997). Estudio biométrico de las poblaciones del subgénero *Larrousius* (Diptera: Psychodidae, Phlebotomus) del sureste de la Península Ibérica. *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 21, 33-47.
- Collin, N., Assumpção, T. C., Mizurini, D. M., Gilmore, D. C., Dutra-Oliveira, A., Kotsyfakis, M., Valenzuela, J. G. (2012). Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2185-2198.
- 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. *Emerging infectious diseases*, 4, 451-452.
- Conesa-Gallego, E. C., Lozano, E. R., Ortega, E. M. (1997). Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Comunidad de Madrid (España). In *Anales de Biología* (No. 22, pp. 43-50).
- Conesa-Gallego, E., Romera Lozano, H., Martínez Ortega, E. (1995). Seasonal dynamics of *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Madrid (Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, 55, 259–261.
- Cook, G. C. (1992). Effect of global warming on the distribution of parasitic and other infectious diseases: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 85(11), 688.
- Cortes, S., Maurício, I. L., Kuhls, K., Nunes, M., Lopes, C., Marcos, M., Campino, L. (2014). Genetic diversity evaluation on Portuguese *Leishmania infantum* strains by multilocus microsatellite typing. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, 20-31.
- Cortes, S., Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão, J. M., Pratlong, F., Dedet, J. P., Campino, L. (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology international*, 55(4), 277-283.
- Costa, C. H. N. (2008). Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 24(12), 2959-2963.

Cotteaux-Lautard, C., Leparç-Goffart, I., Berenger, J. M., Plumet, S., Pages, F. (2016). Phenology and host preferences *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Phlebotominae) in a focus of Toscana virus (TOSV) in South of France. *Acta tropica*, 153, 64-69.

Coulibaly, C.A., Samake, S., Meneses, C., Sissoko, I., Fairhurst, R.M., Fay, M.P., Anderson, Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L. M., Dye, C. (2002). Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology*, 125(5), 407-414.

Cox, F. E. G. (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, 122(S1), S23-S38.

Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, 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. *Veterinary parasitology*, 92(4), 245-251.

Croset, H., Rioux, J. A., Juminer, B., Tour, S. (1970). Annual fluctuations of populations of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, *Phlebotomus perfiliewi* Parrot, 1930 and *Sergentomyia minuta* parroti (Adler and Theodor, 1927) (Diptera-Psychodidae) in northern Tunisia. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 47(1/2), 43-56.

Cross, E. R., Hyams, K. C. (1996). The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Environmental health perspectives*, 104(7), 724.

Czerny, L. Strobl, G., 1909. Spanische Dipteren III. Beitrag. Z. B. Ges., 59, 121-301.

da Costa-Val, A. P., Cavalcanti, R. R., de Figueiredo Gontijo, N., Michalick, M. S. M., Alexander, B., Williams, P., Melo, M. N. (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal*, 174(3), 636-643.

da Paixão Sevá, A., Martcheva, M., Tuncer, N., Fontana, I., Carrillo, E., Moreno, J., Keesling, J. (2017). Efficacies of prevention and control measures applied during an outbreak in Southwest Madrid, Spain. *PloS one*, 12(10), e0186372.

da Silva, S. M., Rabelo, P. F. B., de Figueiredo Gontijo, N., Ribeiro, R. R., Melo, M. N., Ribeiro, V. M., Michalick, M. S. M. (2010). First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Veterinary parasitology*, 174(1-2), 150-154.

Dancesco, P., Chadli, A. (1982). Bioecologic aspects of Phlebotomine sandflies in relation to human and canine visceral leishmaniasis in northern Tunisia. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 59(2-3), 225-241.

Dancesco, P., Dedet, J. P., Osman, F. B., Chadli, A. (1970). Phlebotomes captures dans des foyers de leishmaniose canine a Tunis. role probable de *P. perniciosus* et *P. perfiliewi* dans la transmission. *Inst Pasteur Tunis Arch.*

Dantas-Torres, F., Tarallo, V. D., Otranto, D. (2014). Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasites & vectors*, 7(1), 479.

Daulatabad, D., Singal, A., Dhawan, A., Pandhi, D., Sharma, S. (2015). Mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* infection in an Indian man. *International journal of dermatology*, 54(6), 680-684.

Davis, N. T. (1967). Leishmaniasis in the Sudan republic. 28. Anatomical studies on *Phlebotomus orientalis* Parrot and *P. papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 4(1), 50-65.

de Almeida, D. N., Oliveira, R. D. S., Brazil, B. G., Soares, M. J. (2004). Patterns of exochorion ornaments on eggs of seven South American species of *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 41(5), 819-825.

de Vries, H. J., Reedijk, S. H., Schallig, H. D. (2015). Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology*, 16(2), 99-109.

de Ybáñez, R. R., Del Río, L., Martínez-Carrasco, C., Segovia, M., Cox, J., Davies, C., Berriatua, E. (2009). Questionnaire survey on Canine Leishmaniosis in southeastern Spain. *Veterinary parasitology*, 164(2-4), 124-133.

Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rua, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C.I., Goyena, E., García-Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., Berriatua, E., (2014). Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev Vet Med* 113, 430-435.

Depaquit, J. (2014). Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 744-756.

Deplazes, P., Smith, N. C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J. (1995). Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite immunology*, 17(9), 451-458.

Disney, R. H. L. (1966). A trap for phlebotomine sandflies attracted to rats. *Bulletin of Entomological Research*, 56(3), 445-451.

Dokianakis, E., Tsirigotakis, N., Christodoulou, V., Poulakakis, N., Antoniou, M. (2016). DNA sequencing confirms PCR-RFLP identification of wild caught *Larrousius* sand flies from Crete and Cyprus. *Acta tropica*, 164, 314-320.

Dolmatova, A. V., Demina, N. A., Kobylansky, A., Abonnenc, E., Rageau, J. (1971). Les phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent. *Editions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM), Initiations-Documentations Techniques*, 18.

Dorval, M. E. C., Alves, T. P., Cristaldo, G., Rocha, H. C. D., Alves, M. A., Oshiro, E. T., de Oliveira, G. A., Cunha, R. V. D. (2010). Sand fly captures with Disney traps in area of occurrence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the State of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(5), 491-495.

Dougherty, M.J., Hamilton, J.G.C., (1996). A biologically-active compound from pupae of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its possible role in defence. *Bulletin of Entomological Research* 86, 11-16.

Drahota, J., Martin-Martin, I., Sumova, P., Rohousova, I., Jimenez, M., Molina, R., Volf, P. (2014). Recombinant antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniasis vector. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(1), e2597.

Drame, P.M., Poinsignon, A., Besnard, P., Cornelie, S., Le Mire, J., Toto, J.C., Foumane, V., Dos- Santos, M.A., Sembene, M., Fortes, F., Simondon, F., Carnevale, P., Remoue, F. (2010) Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83(1), 115-121.

Dujardin, J. C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Ozbek, Y., Boelaert, M. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging infectious diseases*, 14(7), 1013.

Dujardin, J. P., Le Pont, F., Martinez, E. (1999). Quantitative phenetics and taxonomy of some phlebotomine taxa. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(6), 735-741.

Durán-Martínez, M., Ferroglio, E., Acevedo, P., Trisciuglio, A., Zanet, S., Gortázar, C., Ruiz-Fons, F. (2013). *Leishmania infantum* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) phlebotomine sand fly vectors in continental mediterranean Spain. *Environmental entomology*, 42(6), 1157-1165.

Dvorak, V., Aytikin, A. M., Alten, B., Skarupova, S., Votypka, J., Volf, P. (2006). A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae). *Journal of Vector Ecology*, 31(2), 229-238.

- Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P. (2014). Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasites & vectors*, 7(1), 21.
- El-Hamouchi, A., Ejghal, R., Hida, M., Lemrani, M. (2017). Intraspecific genetic variability in a population of Moroccan *Leishmania infantum* revealed by PCR-RFLP of kDNA minicircles. *Acta tropica*, 169, 142-149.
- El-Kammah, K. M. (1973). Studies of autogeny in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli)(Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 10(3), 261-263.
- El-Hossary, S. (2006). Morphological characteristics for sand fly taxonomy. *Research and Training Center on Vector of Diseases, Ain Shams University, Cairo, Egypt*, 1-25.
- 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. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 63(6), 387-397. España. *Bayer HealthCare*, 112.
- Faiman, R., Cuño, R., Warburg, A. (2009a). Comparative efficacy of three suction traps for collecting phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in open habitats. *Journal of Vector Ecology*, 34(1), 114-118.
- Faiman, R., Cuno, R., Warburg, A. (2009b). Control of phlebotomine sand flies with vertical fine-mesh nets. *Journal of medical entomology*, 46(4), 820-831.
- Faiman, R., Kirstein, O., Moncaz, A., Guetta, H., Warburg, A. (2011). Studies on the flight patterns of foraging sand flies. *Acta tropica*, 120(1-2), 110-114.
- Fares, W., Charrel, R. N., Dachraoui, K., Bichaud, L., Barhoumi, W., Derbali, M., Zhioua, E. (2015). Infection of sand flies collected from different bio-geographical areas of Tunisia with phleboviruses. *Acta tropica*, 141, 1-6.
- Feliciangeli, M. D. (2004). Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and veterinary entomology*, 18(1), 71-80.
- Fernandes, A. P., Costa, M. M. S., Coelho, E. A. F., Michalick, M. S. M., de Freitas, E., Melo, M. N., Gazzinelli, R. T. (2008). Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26(46), 5888-5895.
- Fernández-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L. (2006). Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Veterinary parasitology*, 135(2), 181-185.

- Ferrer, L. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis. In *International Canine Leishmaniasis Forum* (Vol. 1, pp. 6-10).
- Ferrer, L. (2002). The pathology of canine leishmaniasis. In *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Seville, Spain* (pp. 21-24).
- Ferreras, P., Díaz-Ruiz, F., Alves, P.C., Monterroso, P. (2011). Factores de la coexistencia de mesocarnívoros en parques nacionales de ambiente mediterráneo. *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales, 2014*.
- Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., Morrison, A. C. (1997). Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of medical entomology, 34*(6), 719-728.
- Ferroglio, E., Maroli, M., Gastaldo, S., Mignone, W., Rossi, L. (2005). Canine leishmaniasis, Italy. *Emerging infectious diseases, 11*(10), 1618.
- Ferroglio, E., Poggi, M., Trisciuglio, A. (2008). Evaluation of 65% Permethrin Spot-on and Deltamethrin-impregnated Collars for Canine *Leishmania infantum* Infection Prevention. *Zoonoses and public health, 55*(3), 145-148.
- Ferrolho, J., Maia, C., Gomes, J., Alves-Pires, C., Cristóvão, J. M., Campino, L., Afonso, M. O. (2015). Rotation of the external genitalia in male Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in laboratory conditions and in captured specimens in Algarve, Portugal. *Acta tropica, 150*, 1-3.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portus, M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. *Veterinary Parasitology, 83*(2), 87-97
- Fischer, D., Moeller, P., Thomas, S. M., Naucke, T. J., Beierkuhnlein, C. (2011). Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS neglected tropical diseases, 5*(11), e1407.
- Fischer, D., Thomas, S. M., Beierkuhnlein, C. (2011). Modelling climatic suitability and dispersal for disease vectors: the example of a phlebotomine sandfly in Europe. *Procedia Environmental Sciences, 7*, 164-169.
- Fischer, D., Thomas, S., Beierkuhnlein, C. (2010). Climate change effects on vectorborne diseases in Europe. *Nova Acta Leopoldina, 384*, 99-107.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Missé, D., Pagès, F., Fusai, T., Almeras, L. (2011). Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & vectors, 4*(1), 187.

França-Silva, J.C., da Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L., da Costa, C.A., Mayrink, W., Vieira, E.P., Costa, J.S., Genaro, O., Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary parasitology*, 111(2-3), 161-173.

Francischetti, I. M., Pham, V. M., Mans, B. J., Andersen, J. F., Mather, T. N., Lane, R. S., Ribeiro, J. M. (2005). The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(10), 1142-1161.

Franco, F. A., Morillas-Márquez, F., Barón, S. D., Morales-Yuste, M., Gálvez, R., Díaz, V., Afonso, M. O. (2010). Genetic structure of *Phlebotomus (Larrousius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: epidemiological implications. *International journal for parasitology*, 40(11), 1335-1346.

Freites-Martinez, A., Córdoba, S., Bermejo, A., Borbujo, J. (2015). Mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* var *Lombardi* in an immunocompetent patient, Spain. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 33(7), 499-500.

Gaglio, G., Brianti, E., Napoli, E., Falsone, L., Dantas-Torres, F., Tarallo, V. D., Giannetto, S. (2014). Effect of night time-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. *Acta tropica*, 133, 73-77.

Gállego, M. (2004). Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 23(2), 661-676.

Gallego, M., Pratlong, F., Fisa, R., Riera, C., Rioux, J. A., Dedet, J. P., Portus, 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(3), 269.

Gállego-Berenguer J. (2006). Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Editions Universita't de Barcelona. Barcelona. 491 p. ISBN 84-475-3141-4.

Gállego-Berenguer, J., Botet, J., Vynieta, M. P., Gállego, M. (1992). Los flebótomos de la España peninsular e Islas Baleares: identificación y corología: comentarios sobre los métodos de captura. In *In memoriam al profesor doctor D. Francisco de Paula Martínez Gómez*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cordoba. 581-600.

Gálvez, R., Descalzo, M. A., Guerrero, I., Miró, G., Molina, R. (2011). Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector in the madrid region

(Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 11(7), 799-806.

Gálvez, R., Descalzo, M. A., Miró, G., Jiménez, M. I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R. (2010). Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta tropica*, 115(1-2), 95-102.

García, C. C., Sarria, F. A. (2006). El clima de la Región de Murcia. In *El medio físico de la Región de Murcia*. Universidad de Murcia, 95-128.

García, N., Moreno, I., Alvarez, J., De La Cruz, M. L., Navarro, A., Pérez-Sancho, M., Prieto, A. (2014). Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain. *BioMed research international*, 2014: 5 pp

Geraci, N. S., Mukbel, R. M., Kemp, M. T., Wadsworth, M. N., Lesho, E., Stayback, G. M., Ramalho-Ortigao, M. (2014). Profiling of human acquired immunity against the salivary proteins of *Phlebotomus papatasi* reveals clusters of differential immunoreactivity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 90(5), 923-938.

Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M., Darghouth, M. A. (2015). Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Revue Scientifique et Technique*, 34(2), 613-626.

Giavedoni, P., Iranzo, P., Fuertes, I., Estrach, T., Gibert, M. A. (2015). Cutaneous leishmaniasis: 20 years' experience in a Spanish tertiary care hospital. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 106(4), 310-316.

Gidwani, K., Picado, A., Rijal, S., Singh, S.P., Roy, L., Volfova, V., Andersen, E.W., Uranw, S., Ostyn, B., Sudarshan, M., Chakravarty, J., Volf, P., Sundar, S., Boelaert, M., Rogers, M.E., (2011). Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(9), e1296.

Gil-Collado, J., Márquez, F. M., Marín, M. S. (1989). Los flebotomos en España. *Revista de Sanidad e Higiene Pública.*, 63, 15-34.

Giorgobiani, E., Lawyer, P. G., Babuadze, G., Dolidze, N., Jochim, R. C., Tskhvaradze, L., Kamhawi, S. (2012). Incrimination of *Phlebotomus kandelakii* and *Phlebotomus balcanicus* as vectors of *Leishmania infantum* in Tbilisi, Georgia. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(4), e1609.

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), 1136-1147.

Giunchetti, R. C., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., Brodskyn, C. (2008a). A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*, 26(5), 623-638.

Giunchetti, R. C., Reis, A. B., da Silveira-Lemos, D., Martins-Filho, O. A., Corrêa-Oliveira, R., Bethony, J., Nascimento, E. (2008b). Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Research in veterinary science*, 85(1), 106-112.

Gomes, R.B., Mendonca, I.L., Silva, V.C., Ruas, J., Silva, M.B., Cruz, M.S., Barral, A., Costa, C.H. (2007). Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(2), 127-133.

Gomes, Y., Cavalcanti, M.P., Lira, R., Abath, F., Alves, L., (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal* 175, 45-52.

Gomez, S. A., Picado, A. (2017). Systemic insecticides used in dogs: potential candidates for phlebotomine vector control? *Tropical Medicine & International Health*, 22(6), 755-764.

González, E., Álvarez, A., Ruiz, S., Molina, R., Jiménez, M. (2017b). Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR. *Acta Tropica*. In press.

González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., Molina, R. (2017a). Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasites & vectors*, 10(1), 368.

Gossage, S. M., Rogers, M. E., Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology*, 33(10), 1027-1034.

Goyena, E., Pérez-Cutillas, P., Chitimia, L., Risueño, J., García-Martínez, J. D., Bernal, L. J., Berriatua, E. (2016). A cross-sectional study of the impact of regular use of insecticides in dogs on canine leishmaniasis seroprevalence in southeast Spain. *Preventive veterinary medicine*, 124, 78-84.

- Gradoni, L., Pozio, E., Gramiccia, M., Maroli, M., Bettini, S. (1983). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 427-431.
- Greiner, M., Gardner, I. A. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive veterinary medicine*, 45(1-2), 3-22.
- Grimm, F., Jenni, L. (1993). Human serum resistant promastigotes of *Leishmania infantum* in the midgut of *Phlebotomus perniciosus*. *Acta tropica*, 52(4), 267-273.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A. (2009). Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco. *Journal of medical entomology*, 46(5), 1187-1194.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., Laamrani, A. (2006). Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas Mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. *Acta tropica*, 97(3), 346-351.
- Guernaoui, S., Pesson, B., Boumezzough, A., Pichon, G. (2005). Distribution of phlebotomine sandflies, of the subgenus *Larrousius*, in Morocco. *Medical and veterinary Entomology*, 19(1), 111-115.
- Gupta, G., Oghumu, S., Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 82, pp. 155-184). Academic Press.
- Hamasaki, R., Kato, H., Terayama, Y., Iwata, H., Valenzuela, J. G. (2009). Functional characterization of a salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major*. *Journal of insect physiology*, 55(11), 1044-1049.
- Hanson, W. J. (1961). The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (Diptera, Psychodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 54(3), 317-322.
- Hernández-Torres, A., García-Vázquez, E., Bravo-Urbieta, J., Morell, E. B., Alcaraz-Vidal, B., Sánchez-Serrano, A., Gómez, J. G. (2015). La leishmaniasis visceral en la región de Murcia: estudio multicéntrico 1997-2013. *Infectio*, 19(1), 24-30.
- Hernández-Martínez, L. (2016). Estudio de la infección por *Leishmania infantum* en el perro: utilidad de las técnicas diagnósticas no invasivas y nuevas alternativas terapéuticas Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Herrador, Z., Gherasim, A., Jimenez, B. C., Granados, M., San Martín, J. V., Aparicio, P. (2015). Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-

based records, 1997–2011: raising awareness towards leishmaniasis in non-HIV patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3), e0003594.

Hostomska, J., Rohousova, I., Volfova, V., Stanneck, D., Mencke, N., Volf, P. (2008). Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(4), 443-450.

Hostomská, J., Volfová, V., Mu, J., Garfield, M., Rohoušová, I., Volf, P., Jochim, R. C. (2009). Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC genomics*, 10(1), 282.

Houin, R. (1963). Données épidémiologiques et déductions prophylactiques sur les leishmanioses autochtones en France. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 38(3), 379-438.

Hutcheson, J. (1991). Malaise trap collection jar : a cheap simple modification. *New Zealand Entomologist*, 14(1), 48-49.

Jarvis, E. K., Rutledge, L. C. (1992). Laboratory observations on mating and leklike aggregations in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 29(2), 171-177.

Jecna, L., Dostalova, A., Wilson, R., Seblova, V., Chang, K. P., Bates, P. A., Volf, P. (2013). The role of surface glycoconjugates in *Leishmania* midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies. *Parasitology*, 140(8), 1026-1032.

Jiménez, M., Ferrer-Dufol, M., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Molina, R., Lagun, F., López-Vélez, R., Cercenado, E., Daudén, E., Blazquez, J. (1995). Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiology Letters*, 131(2), 197-204.

Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., Molina, R. (2013) Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitology research*, 112(7), 2453-2459.

Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R. (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Veterinary parasitology*, 202(3-4), 296-300.

Jones, B., Kenward, M. (2014). Design and Analysis of Cross-Over Trials, Third Edition. New York: Chapman and Hall/CRC.

- Jusi, M. M. G., Starke-Buzetti, W. A., Oliveira, T. M. F. D. S., Tenório, M. D. S., Sousa, L. D. O. D., Machado, R. Z. (2011). Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(3), 219-222.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends in parasitology*, 22(9), 439-445.
- Kedzierski, L. (2010). Leishmaniasis vaccine: where are we today? *Journal of global infectious diseases*, 2(2), 177.
- Keenan, C. M., Hendricks, L. D., Lightner, L., Webster, H. K., Johnson, A. J. (1984). Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Veterinary Pathology*, 21(1), 74-79.
- Khan, K., Wahid, S., Khan, N. H., Shah, S. U., Atta-Ur-Rahman, Sarwar, B., Ali, N. (2018). Geospatial and Climatic Patterns Associated with the Distribution of Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Vectors of Leishmaniasis in Pakistan. *Journal of medical entomology*, 55(3), 626-633.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J. A. (1991). Intravectorial cycle of Leishmania in sandflies. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 66, 71-74.
- Killick-Kendrick, R. (1990a). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, 4(1), 1-24.
- Killick-Kendrick, R., (1990b). The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine Comparee* 65 Suppl 1, 37-42.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, 17(3), 279-289.
- Killick-Kendrick, R. (2002). The life-cycles of Leishmania in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*, 57.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. (1999). Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. *Canine Leishmaniasis: An Update*, 26-31.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M. P., Cadiergues, M. C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and veterinary entomology*, 11(2), 105-111.

Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Tang, Y., Bastien, P. (1996). Metacyclic promastigotes of *Leishmania* in the salivary glands of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*, 3(1), 55-60.

Killick-Kendrick, R., Rioux, J. A., Ratify, M., Guy, M. W., Wilkes, T. J., Guy, F. M., Perieres, J. (1984). Ecology of leishmaniasis in the south of France-20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 59(6), 555-572.

Killick-Kendrick, R., Wilkes, T. J., Alexander, J., Bray, R. S., Rioux, J. A., Bailly, M. (1985). The distance of attraction of CDC light traps to phlebotomine sandflies. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 60(6), 763-767.

Killick-Kendrick, R., Wilkes, T. J., Bailly, M., Bailly, I., Righton, L. A. (1986). Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(1), 138-142.

Kim, B. (2017). Western Blot Techniques. *Molecular Profiling: Methods and Protocols*, 133-139.

Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., Fay, M.P., Kamhawi, S., Sacks, D., (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 10125-10130.

Kimutai, A., Ngeiywa, M., Mulaa, M., Njagi, P. G., Ingonga, J., Nyamwamu, L. B., Ngumbi, P. (2017). Repellent effects of the essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Tagetes minuta* on the sandfly, *Phlebotomus duboscqi*. *BMC research notes*, 10(1), 98.

Kirkwood, B. R., Sterne, J. A. (2010). *Essential medical statistics*. John Wiley & Sons.

Kleinbaum, D. G., Kupper, L. L., Muller, K. E., Nizam, A. (1998). Selecting the best regression equation. *Applied regression analysis and other multivariable methods*, 3, 386-422.

Koch, L. K., Kochmann, J., Klimpel, S., Cunze, S. (2017). Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. *Scientific reports*, 7(1), 13325.

Kostalova, T., Lestinova, T., Maia, C., Sumova, P., Vlkova, M., Willen, L., Veronesi, F. (2017). The recombinant protein rSP03B is a valid antigen for screening dog exposure to *Phlebotomus perniciosus* across foci of canine leishmaniasis. *Medical and veterinary entomology*, 31(1), 88-93.

Kostalova, T., Lestinova, T., Sumova, P., Vlkova, M., Rohousova, I., Berriatua, E., Gradoni, L. (2015). Canine antibodies against salivary recombinant proteins of *Phlebotomus*

perniciosus: A longitudinal study in an endemic focus of canine leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(6), e0003855.

Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Saridomichelakis, M. N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K. G. (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(5), 376-383.

Krenn, H. W., Aspöck, H. (2012). Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod structure & development*, 41(2), 101-118.

Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Mauricio, I. (2008). Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(7), e261

Kumar, N. P., Srinivasan, R., Jambulingam, P. (2012). DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 414-420.

Lahouiti, K., Alami, A. E. O., Hmamouch, A., Bekhti, K. (2014). Phototropism of sand flies species (Diptera: Psychodidae) collected in a rural locality in Central Morocco. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 6(5), 66-74.

Lamarre, G. P., Molto, Q., Fine, P. V., Baraloto, C. (2012). A comparison of two common flight interception traps to survey tropical arthropods. *ZooKeys*, (216), 43.

Lane, R. P. (1993). Sandflies (phlebotominae). In *Medical insects and arachnids* (pp. 78-119). Springer, Dordrecht.

Lane, R., Phillips, A., Molyneux, D. H., Procter, G., Ward, R. D. (1985). Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 79(2), 225-229.

Laskay, T., Van Zandbergen, G., Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes—Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in microbiology*, 11(5), 210-214.

Laurenti, M.D., Rossi, C.N., da Matta, V.L.R., Tomokane, T.Y., Corbett, C.E.P., Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P., Marcondes, M. (2013). Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Veterinary parasitology*, 196(3-4), 296-300.

Lawyer P, Rowton E, Westbrooke K. (2011) Recognition, identification, mounting and dissection of Phlebotomine sand flies. Kusadasi: *7th International Symposium on Phlebotomine Sand flies*; 2–15.

Le-Ba-Kim (1935) Les acquisitions récentes sur le problème de la transmission de la leishmaniose viscérale. Thèse de Médecine, Marseille, 18

Léger, N., Depaquit, J. (1999). Les phlébotomes. En: Dedet J.P. (Ed). Les leishmanioses. Ellipses. pp. 89-108.

Léger, N., Depaquit, J. (2002). Systématique et biogéographie des Phlébotomes (Diptera: Psychodidae). Annales de la Société Entomologique de France, 38,163-175.

Lestinova, T., Rohousova, I., Sima, M., de Oliveira, C. I., Volf, P. (2017). Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(7), e0005600.

Lewis D. J. (1982). A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera: Psychodidae). *Bull Br Mus (Nat Hist) (Ent)* 45: 121-209.

Lewis, D. J. (1975). Functional morphology of the mouth parts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ecological Entomology*, 126(4), 497-532.

Lewis, D. J., Young, D. G., Fairchild, G. B., Minter, D. M. (1977). Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*, 2(4), 319-332.

Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M., Moncada, S. (1990). Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Immunology*, 144(12), 4794-4797.

Lisi, O., D'Urso, V., Vaccaluzzo, V., Bongiorno, G., Khoury, C., Severini, F., Maroli, M. (2014). Persistence of phlebotomine Leishmania vectors in urban sites of Catania (Sicily, Italy). *Parasites & vectors*, 7(1), 560.

Lladó, M. T., Rotger, M. J. (1990). Estudio del flebotomo como vector de la leishmaniasis en la isla de Mallorca. *Conselleria de Sanitat i Seguretat Social. Govern Balear, Palma de Mallorca*, 109.

Lladró, S., Picado, A., Ballart, C., Portús, M., Gállego, M. (2017). Management, prevention and treatment of canine leishmaniosis in north-eastern Spain: an online questionnaire-based survey in the province of Girona with special emphasis on new preventive methods (CaniLeish vaccine and domperidone). *The Veterinary record*, 180(2), 47-47.

Longstaffe, J. A., Guy, M. W. (1985). Leishmaniasis in dogs. *Veterinary Annual*, 25, 358-367.

- Lopes, E. G., Sevá, A. P., Ferreira, F., Nunes, C. M., Keid, L. B., Hiramoto, R. M., Galati, E. A. B. (2017). Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiology Infection*, 145(12), 2436-2444.
- López-Martín, J. M. (2010). Zorro–Vulpes vulpes Linnaeus, 1758. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*.
- Loría-Cervera, E. N., Andrade-Narváez, F. J. (2014). Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(1), 1-11.
- Lucientes-Curdi, J., Castillo, J. A., Gracia, M. J., Peribañez, M. A. (2005). Flebotomos, de la biología al control. *Revista electrónica de veterinária REDVET*, 6(8), 1-7.
- Lucientes-Curdi, J., Osacar, J. J., Calvete, C., Benito, I., Castillo J.A. (1994). Sobre la presencia de *Phlebotomus (Larrousius) langeroni* Nitzulescu, 1930, (Diptera: Psychodidae) en Aragón. *Zapateri Revista Aragonesa Entomología*, 4, 19-22
- Lucientes-Curdi, J., Benito-de-Martin, M. I., Castillo-Hernandez, J. A., Orcajo-Teresa, J. (1991). Seasonal dynamics of *Larrousius* species in Aragon (NE Spain). *Parassitologia*, 33, 381-386.
- Lucientes-Curdi, J., Blasco-Zumeta, J., Zárata, J. J., Arbea, J. I., Latorre, E. (2001). Primeros registros de insectos del género *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) para los Monegros (Zaragoza, España). *Boletín Sociedad Española Aragonesa*, 28, 123-124.
- Mackay, I.M., (2007). Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. *Horizon Scientific Press*.
- Maia, C., Afonso, M. O., Neto, L., Dionísio, L., Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *Journal of vector borne diseases*, 46(4), 268.
- Maia, C., Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary parasitology*, 158(4), 274-287.
- Maia, C., Seblova, V., Sadlova, J., Votypka, J., Volf, P. (2011). Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(6), e1181.
- Malaise, R. (1937). A new insect-trap. *Entomologisk tidskrift*, 58, 148-160.

- Mann, R. S., Kaufman, P. E. (2010). The seasonal abundance of phlebotomine sand flies, *Lutzomyia* species in Florida. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26(1), 10-17.
- Mansueto, P., Vitale, G., Di Lorenzo, G., Rini, G. B., Mansueto, S., Cillari, E. (2007). Immunopathology of leishmaniasis: an update. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 20(3), 435-445.
- Manzillo, V. F., Oliva, G., Pagano, A., Manna, L., Maroli, M., Gradoni, L. (2006). Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary parasitology*, 142(1-2), 142-145.
- Marín Iniesta, F., Marín Iniesta, E., Martín Luengo, F. (1982). Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la region Murciana. Resultados preliminares. *Revista iberica de parasitologia*.
- Marín, M. S. (1986). Flebotomos de la provincia de Almeria: estudio taxonomico e importancia epidemiologica. *Tesis doctoral*, Universidad de Granada, España.
- Maroli, M., Bettini, S. (1977). Leishmaniasis in Tuscany (Italy):(I) An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4), 315-321.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, 27(2), 123-147.
- Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Castagnaro, M., Crotti, A., Lubas, G., Zatelli, A. (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1200-1206.
- Maroli, M., Mizzi, 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. *Medical and veterinary entomology*, 15(4), 358-363.
- Maroli, M., Pennisi, M. G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary parasitology*, 145(3-4), 357-360.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Gradoni, L. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine & International Health*, 13(2), 256-264.

Maroli, M., & Khoury, C. (2004). Prevention and control of leishmaniasis vectors: current approaches. *Parassitologia*, 46(1-2), 211-215.

Martin, V., Vouldoukis, I., Moreno, J., McGahie, D., Gueguen, S., Cuisinier, A. M. (2014). The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (Canileish®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Veterinary research*, 45(1), 69.

Martínez Ortega, E., Conesa Gallego, E. (1987). Fenología de los flebotomos del subgénero Larrousius (Diptera, Psychodidae, Phlebotomus) en el sureste de la Península Ibérica. *Bol Asoc Esp Entomol*, 11, 293-300.

Martínez, L. H. (2015). *Estudio de la infección por leishmania infantum en el perro utilidad de las técnicas no invasivas y nuevas alternativas terapéuticas* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).

Martínez-Carrasco, C., De Ybáñez, M., Sagarminaga, J., Garijo, M., Moreno, F., Acosta, I., Hernandez, S., Alonso, F. (2007). Parasites of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in Murcia, southeast Spain. *Rev Med Vet*, 158, 331-335.

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. (1984) Fenología de *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) (Dtp. Psychodidae, Phlebotominae) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín Asoc. esp. Entom.* 8, 35-39

Martínez-Ortega, E., Conesa-Gállego, E., Lozano, H. R. (1996). *Phlebotomus (Larrousius) langeroni* Nitzulescu, 1930 (Diptera, Psychodidae), espèce nouvelle pour l'Espagne. *Parasite*, 3(1), 77-80.

Martínez-Ortega, E., Conesa Gallego, E., Goyena-Salgado, M., Romera-Lozano, H. (1992). Presencia de *Phlebotomus (Larrousius) langeroni* Nitzulescu, 1930 (Diptera: Psychodidae), en la Península Ibérica. *Bol Soc Port Entomol*, 139, 196.

Martínez-Ortega, E., Conesa-Gallego, E. (1987). Caracteres morfológicos de interés taxonómico de los flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Península Ibérica. In *Anales de Biología* (No. 11, pp. 43-53).

Martínez-Ortega, E., Romera, H., Conesa-Gallego, E., Goyena, M. (1991). Comparative study of anthropophilia and phototropism among sandflies in a focus of leishmaniasis in the southeastern Iberian Peninsula. *Parassitologia*, 33, 413-419.

Martínez-Ortega, E. (1988). Bioclimatic sectorization of sandflies population (Diptera, Psychodidae) in the southeastern of the Iberian Peninsula. *Revista Iberica de Parasitologia*.

Martín-Martín, I., Jiménez, M., González, E., Eguiluz, C., Molina, R. (2015). Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. *Veterinary research*, 46(1), 138.

Martín-Martín, I., Molina, R., Rohoušová, I., Drahotka, J., Volf, P., Jiménez, M. (2014). High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniasis focus in Madrid, Spain. *Veterinary parasitology*, 202(3-4), 207-216.

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. *Veterinary parasitology*, 145(3-4), 267-273.

Martin-Sanchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F. (2004). Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(4), 228-232.

Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F. (2009). Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerging infectious diseases*, 15(5), 795.

Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., Dumon, H. (2004). Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *Journal of clinical microbiology*, 42(11), 5249-5255.

Marzouki, S., Abdeladhim, M., Abdessalem, C.B., Oliveira, F., Ferjani, B., Gilmore, D., Louzir, H., Valenzuela, J.G., Ben Ahmed, M. (2012). Salivary antigen SP32 is the immunodominant target of the antibody response to *Phlebotomus papatasi* bites in humans. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(11), e1911.

Marzouki, S., Ben Ahmed, M., Boussoffara, T., Abdeladhim, M., Aleya-Bouafif, N.B., Namane, A., Hamida, N.B., Salah, A.B., Louzir, H. (2011). Characterization of the antibody response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* in people living in endemic areas of cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 84(5), 653-661.

Marzouki, S., Kammoun-Rebai, W., Bettaieb, J., Abdeladhim, M., Kacem, S. H., Abdelkader, R., Salah, A. B. (2015). Validation of recombinant salivary protein PpSP32 as a suitable marker of human exposure to *Phlebotomus papatasi*, the vector of Leishmania major in Tunisia. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(9), e0003991.

Mathis, A., Depaquit, J., Dvořák, V., Tuten, H., Bañuls, A. L., Halada, P., Volf, P. (2015). Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems. *Parasites & vectors*, 8(1), 266.

Matthews, R. W., Matthews, J. R. (2017). The Malaise trap: its utility and potential for sampling insect populations. *The Great Lakes Entomologist*, 4(4), 4.

McCall, L.-I., Zhang, W.-W., Matlashewski, G. (2013) Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS pathogens*, 9(1), e1003053.

McCall, P.J., Cameron, M.M., (1995). Oviposition pheromones in insect vectors. *Parasitology Today* 11, 352-355.

McCombie-Young, T., Richaiond, A., Brendish, G. R. (1926). Sandflies and sandfly fever in the Peshawar district. *Indian Journal of Medical Research*, 13(4).

McConnell, E. E., Chaffee, E. F., Cashell, I. G., Garner, F. M. (1970). Visceral leishmaniasis with ocular involvement in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 156, 197-203.

Mencke, N., Volf, P., Volfova, V., Stanneck, D. (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitology Research*, 90(3), S108-S111.

Mercier, P., Jasmin, P., Sanquer, A. (2003). Prevention of sand fly attack by topical application of a permethrin/pyriproxyfen combination on dogs. *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine*.

Meseguer, E. G. (2006). Los paisajes agrarios de la Región de Murcia. *Papeles de geografía*, (43), 19-30.

Metzdorf, I.P., Junior, M.S.d.C.L., Matos, M.d.F.C., de Souza Filho, A.F., de Souza Tsujisaki, R.A., Franco, K.G., Shapiro, J.T., de Almeida Borges, F. (2017). Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta tropica*, 166, 121-125

Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha, A.C.V.M., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, Á.J. (2007). Infectivity of

seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary parasitology*, 147(1-2), 67-76.

Millán, J., Ferroglio, E., Solano-Gallego, L. (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology research*, 113(6), 2005-2014

Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E. (2011). An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transboundary and emerging diseases*, 58(4), 352-357.

Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Gálvez, R. (2012). Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasites & vectors*, 5(1), 60.

Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M. A., Molina, R. (2007a). Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary parasitology*, 143(3-4), 375-379.

Miró, G., Molina, R. (2006). Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España, 2006. *Spain: Bayer Health Care*.

Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., Molina, R. (2007b). A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitology research*, 101(2), 253-257.

Miró, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Oliva, G. (2017). Novel areas for prevention and control of canine leishmaniosis. *Trends in parasitology*, 33(9), 718-730.

Miró, G., Troyano, A., Montoya, A., Fariñas, F., Fermín, M.L., Flores, L., Rojo, C., Checa, R., Gálvez, R., Marino, V (2018). First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. *Parasites & vectors*, 11(1), 185.

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J., Lucientes-Curdí, J., Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 491-493.

Molina, R., Aransay, A., Nieto, J., Cañavate, C., Chicharro, C., Sans, A., Flores, M., Cruz, I., García, E., Cuadrado, J., Alvar, J. (2005). The phlebotomine sand flies of Ibiza and Formentera islands (Spain). *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 82: 12-13.

- Molina, R., Espinosa-Góngora, C., Gálvez, R., Montoya, A., Descalzo, M. A., Jiménez, M. I., Miró, G. (2012a). Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary parasitology*, 187(3-4), 529-533.
- Molina, R., Jiménez, M., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J. (2012b) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary parasitology*, 190(1-2), 268-271
- Molina, R., Lohse, J. M., Nieto, J. (2001). Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Veterinary Therapeutics*, 2(3), 261-267.
- Molina, R., Miró, G., Galvez, R., Nieto, J., Descalzo, M. A. (2006). Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *The Veterinary Record*, 159, 206-209.
- Montoya, A., de Quadros, L.P., Mateo, M., Hernández, L., Gálvez, R., Alcántara, G., Checa, R., Jiménez, M.Á., Chicharro, C., Cruz, I. (2016). *Leishmania infantum* infection in bennett's wallabies (*macropus rufogriseus rufogriseus*) in a spanish wildlife park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(2), 586-593.
- Montoya-Lerma, J. (1992). Autogeny in the neotropical sand fly *Lutzomyia lichi* (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *Journal of medical entomology*, 29(4), 698-699.
- Montoya-Lerma, J., Lane, R. P. (1996). Factors affecting host preference of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Bulletin of Entomological Research*, 86(1), 43-50.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Barón-López, S., Acedo-Sánchez, C., Martín-Sánchez, J. (2012). Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitology research*, 111(1), 155-164.
- Moreno, J., Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in parasitology*, 18(9), 399-405.
- Morillas-Márquez, F. M., Sanchís, M. M., Martín, J. S., Acedo, C. S. (1991). On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the Province of Almeria in southeastern Spain. *Parassitologia*, 33, 437-444.
- Morillas-Márquez, F., Rabasco, F. S., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocaña-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchiz Marin, M. C. (1996). Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitology research*, 82(6), 569-570.

Morillas-Márquez, F., Guevara, B. D., Ubeda, O. J., González, C. J. (1983). Annual fluctuations of *Phlebotomus* populations (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Granada (Spain). *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 58(6), 625.

Morillas-Márquez, F. (1982). Epidemiología de la Leishmaniosis en la provincia de Granada; estudio biométrico, sistemático y del ciclo anual de los flebótomos. *Diptera, Phlebotomidae*). Tesis Doctoral de Farmacia, Granada, España.

Morillas-Márquez, F., Benavides Delgado, I., González Castro, J., Reyes Magana, A., Valero López, A. (1985). Découverte de *Leishmania* sp. dans des *Rattus rattus* de la Province de Grenade (Espagne). *Annales de parasitologie humaine et comparée*.

Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Morillas-Mancilla, M. J., Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Gijón-Robles, P., Martín-Sánchez, J. (2017). Phlebotomine sandflies (Diptera, Phlebotomidae) of Lanzarote Island (Canary Islands, Spain): Ecological survey and evaluation of the risk of *Leishmania* transmission. *Acta Tropica*, 168, 16-20

Müller, G. C., Junnila, A., Kravchenko, V. D., Revay, E. E., Butler, J., Schlein, Y. (2008). Indoor protection against mosquito and sand fly bites: a comparison between citronella, linalool, and geraniol candles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(1), 150-153.

Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C., (2013). First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta tropica*, 128(3), 706-709.

Munstermann, L., (2005). Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae, In: Marquardt, W.C. (Ed.) Biology of disease vectors. *Dana Dreibelbis*, San Diego, California, USA, pp. 141-151

Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366(9496), 1561-1577.

Navea-Pérez, H. M., Díaz-Sáez, V., Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J. (2015). *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitology research*, 114(6), 2363-2370.

Nieto, C. G., Garcia-Alonso, M., Requena, J. M., Miron, 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. *Veterinary immunology and immunopathology*, 67(2), 117-130.

Nieves, E., Buelvas, N., Rondon, M., Gonzalez, N., 2011. The salivary glands of two sand fly vectors of *Leishmania*: *Lutzomyia migonei* (Franca) and *Lutzomyia ovallesi* (Ortiz) (Diptera: Psychodidae). *Biomedica* 30, 401-409.

Nigam, Y., Ward, R. D. (1991). The effect of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Physiological Entomology*, 16(3), 305-312.

Novo, S. P., Leles, D., Bianucci, R., Araujo, A. (2015). *Leishmania tarentolae* molecular signatures in a 300 hundred-years-old human Brazilian mummy. *Parasites & vectors*, 8(1), 72.

Oleaga, A., Vicente, J., Ferroglio, E., de Macedo, M.P., Casais, R., Del Cerro, A., Espí, A., García, E., Gortázar, C. (2015). Concomitance and interactions of pathogens in the Iberian wolf (*Canis lupus*). *Research in veterinary science*, 101, 22-27.

Oliva, G., Nieto, J., Manzillo, V. F., Cappiello, S., Fiorentino, E., Di Muccio, T., Butaud, T. (2014). A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(10), e3213.

Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A. E., Pham, V. M., Guigal, P. M., Fischer, L., Valenzuela, J. G. (2006). From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine*, 24(3), 374-390.

Oliveira, F., Traore, B., Gomes, R., Faye, O., Gilmore, D.C., Keita, S., Traore, P., Teixeira, C., Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., Marzochi, M. C., Andrade, C. A. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta tropica*, 118(2), 87-96.

Oliveira, F., Traoré, B., Gomes, R., Faye, O., Gilmore, D.C., Keita, S., Traoré, P., Teixeira, C., Coulibaly, C.A., Samake, S. (2013). Delayed-type hypersensitivity to sand fly saliva in humans from a leishmaniasis-endemic area of Mali is Th1-mediated and persists to midlife. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(2), 452-459.

OMS, 2010. Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis. *OMS, Serie de informes técnicos nº 949, Ginebra*, 22 a 26 de marzo de 2010.

Ortega, M.V., Moreno, I., Domínguez, M., de la Cruz, M.L., Martín, A.B., Rodríguez-Bertos, A., López, R., Navarro, A., González, S., Mazariegos, M. (2017). Application of a specific quantitative real-time PCR (qPCR) to identify *Leishmania infantum* DNA in spleen, skin and hair samples of wild Leporidae. *Veterinary parasitology*, 243, 92-99.

Ortuño M, Risueño J., Muñoz C., Bernal A., Maia C., Cristovão J.M., Pereira A., Campino L., Berriatua E. (2017). Intraspecific diversity of *Leishmania infantum* from humans, domestic and wild animal hosts. COST Action TD1303 - *Neglected Vectors and Vector-Borne Diseases (EurNegVec) final Conference*, 11-13 September 2017, Chania, Crete, Greece

Otranto, D., Dantas-Torres, F., de Caprariis, D., Di Paola, G., Tarallo, V. D., Latrofa, M. S., Capelli, G. (2013). Prevention of canine leishmaniosis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin. *PLoS One*, 8(2), e56374.

Otranto, D., De Caprariis, D., Lia, R. P., Tarallo, V., Lorusso, V., Testini, G., Maggi, R. G. (2010). Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Veterinary parasitology*, 172(3-4), 323-332.

Otranto, D., Paradies, P., Lia, R. P., Latrofa, M. S., Testini, G., Cantacessi, C. Stanneck, D. (2007). Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, 144(3-4), 270-278.

Ovalle-Bracho, C., Camargo, C., Díaz-Toro, Y., Parra-Muñoz, M. (2018). Tipificación molecular de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* y especies del subgénero *Viannia* asociadas a la leishmaniasis cutánea y la mucosa en Colombia: un estudio de concordancia. *Biomédica*, 38(1), 86-95.

Padrón Municipal de Habitantes. Instituto Nacional Estadística; [consultado 10/05/2016]. Disponible en: <http://www.ine.es>.

Palomares, F., Rodríguez, A., Revilla, E., López-Bao, J. V., Calzada, J. (2011). Assessment of the conservation efforts to prevent extinction of the Iberian lynx. *Conservation Biology*, 25(1), 4-8.

Palosuo, K., Brummer-Korvenkontio, H., Mikkola, J., Sahi, T., Reunala, T. (1997). Seasonal Increase in Human IgE and IgG4 Antisaliva Antibodies to *Aedes* Mosquito Bites. *International archives of allergy and immunology*, 114(4), 367-372.

Peng, Z., Rasic, N., Liu, Y., Simons, F. E. R. (2002). Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors. *Journal of allergy and clinical immunology*, 110(5), 816-817.

Pennisi, M. G. (2002). A high prevalence of feline leishmaniasis in southern Italy. *Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*, 39-48.

Pennisi, M. G., Persichetti, M. F. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?. *Veterinary parasitology*, 251, 131-137.

Pennisi, M.-G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P., Koutinas, A., Miró, G., Oliva, G., Solano-Gallego, L. (2015). LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites & vectors*, 8(1), 302.

Pennisi, M.G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M.J. (2013). Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of feline medicine and surgery*, 15(7), 638-642.

Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Afonso, M. O. (2017). First molecular detection of *Leishmania infantum* in *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) in Alentejo, southern Portugal. *Acta tropica*, 174, 45-48.

Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., Chitimia, L., De la Rúa, P., Bernal, L. J., Fisa, R., Berriatua, E. (2015). Spatial distribution of human asymptomatic *Leishmania infantum* infection in southeast Spain: a study of environmental, demographic and social risk factors. *Acta tropica*, 146, 127-134.

Pesson, B., Ready, J., Benabdennbi, I., Martín-Sánchez, J., Esseghir, S., Cadi-Soussi, M., Morillas-Marquez, F., Ready, P. (2004). Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(1), 25-37.

Pinelli, E., Van der Kaaij, S. Y., Slappendel, R., Fragio, C., Ruitenbergh, E. J., Bernadina, W., Rutten, V. P. M. G. (1999). Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Veterinary immunology and immunopathology*, 69(2-4), 121-126.

Poché, D. M., Poché, R. M., Mukherjee, S., Franckowiak, G. A., Briley, L. N., Somers, D. J., Garlapati, R. B. (2017). Phlebotomine sandfly ecology on the Indian subcontinent: does village vegetation play a role in sandfly distribution in Bihar, India? *Medical and veterinary entomology*, 31(2), 207-213.

Podaliri-Vulpiani, M., Iannetti, L., Paganico, D., Iannino, F., Ferri, N. (2011). Methods of control of the *Leishmania infantum* dog reservoir: state of the art. *Veterinary medicine international*, 2011.

Poeppl, W., Herkner, H., Tobudic, S., Faas, A., Auer, H., Mooseder, G., Walochnik, J. (2013). Seroprevalence and asymptomatic carriage of *Leishmania* spp. in Austria, a non-endemic European country. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6), 572-577.

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 Iber Parasitol*, 62(3-4), 72-6.

- Pou-Barreto, C., Serafín-Pérez, I., Fernández-Serafín, C., Carretón, E., González- Miguel, J., Montoya-Alonso, J., Morchón, R. (2013). Prevalencia en perros infectados por *Leishmania* en la Isla de Tenerife (Islas Canarias). In Proceedings of the XVIII *Congreso de la Sociedad Española de Parasitología*, 153, Las Palmas de Gran Canaria.
- Pozio, E., Maroli, M., Gradoni, L., Gramiccia, M. (1985). Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(4), 524-526.
- Prates, D. B., Santos, L. D., Miranda, J. C., Souza, A. P. A., Palma, M. S., Barral-Netto, M., Barral, A. (2014). Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *Journal of medical entomology*, 45(3), 409-413.
- 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. *Journal of clinical microbiology*, 42(9), 4077-4082.
- Prieto Cerdán, A., Fernández Muñoz, S., Sancho Urío, Sancho (2009). Atlas de los paisajes de la Región de Murcia. *Murcia, Consejería de Obras Públicas y Ordenación del Territorio, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia*.
- Prudhomme, J., Rahola, N., Toty, C., Cassan, C., Roiz, D., Vergnes, B., Bañuls, A. L. (2015). Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France). *Parasites & vectors*, 8(1), 642.
- Pumarola, M., Brevik, L., Badiola, J., Vargas, A., Domingo, M., Ferrer, L. (1991). Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal of comparative pathology*, 105(3), 279-286.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915-1934.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Garcez, L. M., Kaye, P. M., Shaw, M. A., Dye, C., Day, M. J. (2003). IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 91(3-4), 161-168.
- Ramalho-Ortigão, M., Coutinho-Abreu, I. V., Balbino, V. Q., Figueiredo, C. A. S., Mukbel, R., Dayem, H., Hoel, D. F. (2015). *Phlebotomus papatasi* SP15: mRNA expression variability and amino acid sequence polymorphisms of field populations. *Parasites & vectors*, 8(1), 298.

- Ranque, J., Faure, A. (1956). Sensitivity of *Sciurus vulgaris* to visceral leishmaniasis. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*, 49(1), 40-43.
- Ready, P. D. (2008). Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech*, 27(2), 399-412.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15(10), 19505.
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227-250.
- Reed, S. G., Scott, P. (1993). T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current opinion in immunology*, 5(4), 524-531.
- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R. (2009). Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 128(1-3), 87-95.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, 7(9), 581-596.
- Reithinger, R., Teodoro, U., Davies, C. R. (2001). Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerging infectious diseases*, 7(5), 872.
- Ribeiro, J. (1987). Vector salivation and parasite transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, 1-3.
- Ribeiro, J. M., Francischetti, I. M. (2003). Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual review of entomology*, 48(1), 73-88.
- Richter, M., Schaarschmidt-Kiener, D., Krudewig, C. (2014). Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 156, 289-94.
- Riera, C., Valladares, J.E., Gállego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J., Arboix, M. (1999). Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, 84(1-2), 33-47.
- Rioux JA, Lanotte G, Destombes P, Vollhardt J, Croset H (1971). Leishmaniose experimentale du renard *Vulpes vulpes* (L.). *Record of Medicine and Veterinary Ecology D'Alfort* 147: 489-498.

Rioux, J. A., Albaret, J. L., Houin, R., Dedet, J. P., Lanotte, G. (1968). Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 2.-Les réservoirs selvatiques-Infestation spontanée du Renard (*Vulpes vulpes* L.). *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 43(4), 421-428.

Rioux, J. A., Carron, S., Dereure, J., Périères, J., Zeraia, L., Franquet, E., Prudhomme, J. (2013). Ecology of leishmaniasis in the South of France. 22. Reliability and representativeness of 12 *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) sampling stations in Vallespir (eastern French Pyrenees region). *Parasite*, 20.

Rioux, J. A., Golvan, Y. J., Croset, H., Houin, R., Juminer, B., Bain, O., Tour, S. (1967). Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 1.-Les Phlébotomes-Echantillonnage-Ethologie. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 42(6), 561-603.

Rioux, J. A., Golvan, Y. J., Groset, H., Houin, R. (1969). Symposium on exotic zoonoses. Paris, 11th and 12th March 1969. The leishmaniasis in Mediterranean southern France. The results of an ecological survey (cf. 58-598). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 62(2), 167-333.

Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 65(3), 111-125.

Rispail, P., Dereure, J., Jarry, D. (2002). Risk zones of human Leishmaniasis in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4), 477-483.

Rochael, N. C., Lima, L. G., Oliveira, S. M. P. D., Barcinski, M. A., Saraiva, E. M., Monteiro, R. Q., Pinto-da-Silva, L. H. (2013). *Leishmania amazonensis* exhibits phosphatidylserine-dependent procoagulant activity, a process that is counteracted by sandfly saliva. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(6), 679-685.

Rogers, M. E. (2012). The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Frontiers in microbiology*, 3, 223.

Rogers, M. E., Chance, M. L., Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(5), 495-507.

Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A., Bates, P. A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430(6998), 463.

Rogers, M.B., Hilley, J.D., Dickens, N.J., Wilkes, J., Bates, P.A., Depledge, D.P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome research*, 21(12), 2129-2142.

Rogo, L. M., Kokwaro, E. D., Mutinga, M. J., Khamala, C. P. M. (1992). Differentiation of vector species of phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Kenya by chorionic sculpturing of their eggs. *Journal of medical entomology*, 29(6), 1042-1044.

Rohoušová, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., Volf, P. (2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology*, 130(5), 493-499.

Rohoušová, I., Subrahmanyam, S., Volfová, V., Mu, J., Volf, P., Valenzuela, J. G., Jochim, R. C. (2012). Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5), e1660.

Rohoušová, I., Volf, P. (2006). Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia parasitologica*, 53(3), 161.

Romera-Lozano, E., Martínez-Ortega, E. (1998). Datos preliminares sobre el ciclo nictimeral de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus Sergenti* Parrot, 1917 (Diptera, Psychodidae). In *Anales de Biología*, 23, 9-18

Roque, A. L. R., Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251-262.

Rosado, D., Garrudo, R. M., Mirón, C., García-Alonso, M., Navarrete, I., Nieto, C.G. (1997). La leishmaniosis en Zafra (Badajoz, España): estudio del reservorio canino y del agente vectorial. In Proceedings of the V Congreso de la Sociedad Española de Parasitología, Évora, Portugal.

Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Maroli, M. (2008). Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta tropica*, 105(2), 158-165.

Rossi, E., Rinaldi, L., Musella, V., Veneziano, V., Carbone, S., Gradoni, L., Cringoli, G., Maroli, M. (2007). Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy. *Geospatial Health*, 1(2), 191-198.

Roth-Damas, P., Sempere-Manuel, M., Mialaret-Lahiguera, A., Fernández-García, C., Gil-Tomás, J. J., Colomina-Rodríguez, J., Palop-Larrea, V. (2016). Community outbreak of

cutaneous leishmaniasis in La Ribera region of Valencia, Spain: Public Health measures. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*

Roy, Y. (1940). Contribution à l'étude du Kala-azar autochtone à propos des deux premières observations lyonnaises. *Thèse de Médecine*, Lyon, n° 190.

Roze, M. (2002). Ocular manifestations of canine leishmaniasis. Diagnosis and treatment. In *Proceedings from the 27th World Small Animal Veterinary Association [WSAVA] World Congress* (pp. 3-6).

Rüfenacht, S., Sager, H., Müller, N., Schaerer, V., Heier, A., Welle, M. M., Roosje, P. J. (2005). Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *The Veterinary record*, 156(17), 542-545.

Rutledge, L. C., Mosser, H. L. (1972). Biology of immature sandflies (Diptera: Psychodidae) at the bases of trees in Panama. *Environmental Entomology*, 1(3), 300-309.

Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J., Beverley, S. M. (2000). The role of phosphoglycans in Leishmania–sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 406-411.

Sacks, D., Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual reviews in microbiology*, 55(1), 453-483.

Sáez, V.D., Morillas-Márquez, F., Merino-Espinosa, G., Corpas-López, V., Morales-Yuste, M., Pesson, B., Barón-López, S., Lucientes-Curdi, J., Martín-Sánchez, J. (2018). *Phlebotomus langeroni* Nitzulescu (Diptera, Psychodidae) a new vector for *Leishmania infantum* in Europe. *Parasitology research*, 117(4), 1105-1113.

Sanchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sanchez, A., Francino, O. (2008). Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Veterinary research*, 39(3), 1.

Sanchís-Marín, M. (1986). *Flebotomos de la provincia de Almeria: estudio taxonomico e importancia epidemiologica* (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).

Sanz, C. L., Collantes, F., Martínez-Ortega, E. (1998). Rectificación a la primera cita de Flebotomos (Diptera, Psychodidae) en la Península Ibérica. *Graellsia*, 54, 114.

Sanz, J.J., Barja, I., de Stephanis, R., Serra-Cobo, J. (2017). Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid <http://www.vertebradosibericos.org/>.

Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A., Altet, L. (2008). Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Veterinary parasitology*, 158(1-2), 117-120.

Schlein, Y. (1993). Leishmania and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, 9(7), 255-258.

Schlein, Y., Jacobson, R. L., Messer, G. (1992). Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9944-9948.

Schonian, G., Kuhls, K., Mauricio, I. L. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. *Parasitology*, 138(4), 405-425.

Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M., Goldstein, M. D. (1990). Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *American journal of epidemiology*, 132(1), 58-66.

Secundino, N. F. C., Eger-Mangrich, I., Braga, E. M., Santoro, M. M., Pimenta, P. F. P. (2005). Lutzomyia longipalpis peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *Journal of medical entomology*, 42(6), 928-938.

Semenza, J. C., Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet infectious diseases*, 9(6), 365-375.

Sharma, U., Singh, S. (2008). Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45(4), 255-72.

Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E., Karagouni, E. (1999). Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *European journal of epidemiology*, 15(3), 271-276.

Signorini, M., Drigo, M., Marcer, F., Frangipane di Regalbono, A., Gasparini, G., Montarsi, F., Cassini, R. (2013). Comparative field study to evaluate the performance of three different traps for collecting sand flies in northeastern Italy. *Journal of Vector Ecology*, 38(2), 374-378.

Silva, F., Gomes, R., Prates, D., Miranda, J. C., Andrade, B., Barral-Netto, M., Barral, A. (2005). Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to Lutzomyia longipalpis bites. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 72(1), 94-98.

Sima, M., Ferencova, B., Warburg, A., Rohousova, I., Volf, P. (2016). Recombinant salivary proteins of Phlebotomus orientalis are suitable antigens to measure exposure of domestic animals to sand fly bites. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004553.

Slappendel, M., Greene, C. (1990). Leishmaniasis. En: Infectious diseases of the dog and cat (C. Greene, eds.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp. 769-777.

Slappendel, R. J. (1988). Prize-winning paper Jubilee Competition: Canine leishmaniasis: A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 10(1), 1-16.

Snijders, T. A., Kenny, D. A. (1999). The social relations model for family data: A multilevel approach. *Personal Relationships*, 6(4), 471-486.

Soares, B.R., Souza, A.P., Prates, D.B., de Oliveira, C.I., Barral-Netto, M., Miranda, J.C., Barral, A. (2013). Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral leishmaniasis. *Scientific reports*, 3, 2352.

Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M., Trisciuglio, A., Gortázar, C. (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary parasitology*, 155(3-4), 198-203.

Solano-Gallego, L., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Petersen, C., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. (2017). Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. *Trends in parasitology*, 33(9), 706-717.

Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellon, H., Serra, P., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., Ferrer, L. (2003). Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine veterinary journal*, 35(3), 320-323.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, 165(1-2), 1-18.

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. *Veterinary Parasitology*, 90(1-2), 37-45.

Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, 4(1), 86.

Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L. (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. *Veterinary parasitology*, 96(4), 265-276.

Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Alonso, C. (1998). Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*, 36(1), 58-63.

Souza, A.P., Andrade, B.B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J.C., Alcantara, R., Ruiz, D., Soto, M., Teixeira, C.R., Valenzuela, J.G., de Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., Barral-Netto, M., Barral, A. (2010). Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas *PLoS neglected tropical diseases* 4, e649.

Srinivasan, R., Jambulingam, P. (2012). Morphological and anatomical variations among *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *papatasi sensu lato* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 49(3), 441-444.

Srinivasan, R., Panicker, K. N., Dhanda, V. (1993). Population dynamics of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: phlebotomidae) in Pondicherry, India. *Acta tropica*, 54(2), 125-130.

Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Jaffe, C. L. (2007). Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Veterinary research*, 38(4), 547-564.

Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Moros, S., José, M., Molina Moreno, R., Mochales, A. J., Amela Heras, C. (2012). Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain. *Revista española de salud pública*, 86(6), 555-564.

Sundar, S., Chakravarty, J. (2015). An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 16(2), 237-252.

Sutherst, R. W. (2004). Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), 136-173.

Tafuri, W. L., de Oliveira, M. R., Melo, M. N., Tafuri, W. L. (2001). Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary parasitology*, 96(3), 203-212.

Teixeira, C., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Brodskyn, C. I. (2010). Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(3), e638.

Teixeira, C., Gomes, R., Oliveira, F., Meneses, C., Gilmore, D.C., Elnaiem, D.E., Valenzuela, J.G., Tello, A., DoloresGonzález-Mora, R. O., Iriso, A., Vázquez, M. Á. (2015). Los flebotomos del brote de leishmaniasis en el suroeste de la Comunidad de Madrid (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección biológica*, (109), 57-64.

Tenório, M., de Oliveira E Sousa, L., Paixao, M.d.S., Alves, M.F., de Cássia Paulan, S., Lima, F.L., Jusi, M.M.G., Tasca, K.I., Machado, R.Z., Starke-Buzetti, W.A. (2011). Visceral

leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42(4), 608-616.

Theodor, O. (1935). A Study of the Reaction to *Phlebotomus* Bites with Some Remarks on" Harara. "?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(3).

Theodor, O. (1948). Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 39(1), 85-115.

Tomassone, L., Berriatua, E., De Sousa, R., Duscher, G.G., Mihalca, A.D., Silaghi, C., Sprong, H., Zintl, A. (2018). Neglected vector-borne zoonoses in Europe: into the wild. *Veterinary Parasitology*, 251, 17-26.

Tonelli, G. B., Tanure, A., Rêgo, F. D., de Lima Carvalho, G. M., Simões, T. C., Andrade Filho, J. D. (2017). Aspects of the ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Private Natural Heritage Reserve Sanctuary Caraça. *PloS one*, 12(6), e0178628.

Tsakmakidis, I., Angelopoulou, K., Dovas, C.I., Dokianakis, E., Tamvakis, A., Symeonidou, I., Antoniou, M., Diakou, A. (2017). Leishmania infection in rodents in Greece. *Tropical Medicine & International Health*, 22(12), 1523-1532.

Ustrnul, Z., Czekierda, D. (2005). Application of GIS for the development of climatological air temperature maps: an example from Poland. *Meteorological applications*, 12(1), 43-50.

Valenta, D. T., Tang, Y., Anez, N. (1995, September). A new method to determine the distance at which phlebotomine sandflies are attracted to light under field conditions. In *Proceedings of the 2nd International Symposium on Phlebotomine Sand Flies (ISOPS II) Merida, Venezuela. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* (Vol. 35, pp. 353-358).

Valenzuela, J. G., Belkaid, Rowton, Ribeiro, J. M. (2001). The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *Journal of Experimental Biology*, 204(2), 229-237.

Valenzuela, J. G., Charlab, R., Gonzalez, E. C., Miranda-Santos, D., Marinotti, O., Francischetti, I. M. B., Ribeiro, J. M. C. (2002). The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect molecular biology*, 11(2), 149-155.

Vasconcelos, C. O., Coêlho, Z. C. B., Chaves, C. D. S., Teixeira, C. R., Pompeu, M. M. L., Teixeira, M. J. (2014). Distinct cellular migration induced by *Leishmania infantum* chagasi and saliva from *Lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(1), 21-27.

Vinhas, V., Andrade, B. B., Paes, F., Bomura, A., Clarencio, J., Miranda, J. C., Barral-Netto, M. (2007). Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *European journal of immunology*, 37(11), 3111-3121.

Vlková, M., Rohoušová, I., Drahotka, J., Stanneck, D., Kruehwagen, 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.

Vlková, M., Rohoušová, I., Hostomská, J., Pohanková, L., Zidková, L., Drahotka, J., Valenzuela, J.G., Volf, P. (2012). Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(7), e1719.

Vlková, M., Sima, M., Rohoušová, I., Kostalova, T., Sumova, P., Volfova, V., Jaske, E.L., Barbian, K.D., Gebre-Michael, T., Hailu, A., Warburg, A., Ribeiro, J.M., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., Volf, P., (2014). Comparative Analysis of Salivary Gland Transcriptomes of *Phlebotomus orientalis* Sand Flies from Endemic and Non-endemic Foci of Visceral Leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(2), e2709.

Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., Votypka, J. (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International journal for parasitology*, 34(11), 1221-1227.

Volf, P., Tesařová, P., Nohýnkova, E. (2000). Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical and veterinary entomology*, 14(3), 251-256.

Volf, P., Volfova, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36(s1).

Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D. E. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*, 31(6), 507-520.

Votypka, J., Pavlasova, M., Volfova, V., Volf, P. (2015). Rotation of male genitalia in various species of phlebotomine sandfly. *Medical and veterinary entomology*, 29(4), 355-360.

Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G. C., Titus, R. G., Neva, F. (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 345(1312), 223-230.

- Warburg, A., Schlein, Y. (1986). The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 35(5), 926-930.
- Ward, R. D., Hamilton, J. G. C., Dougherty, M., Falcão, A. L., Feliciangeli, M. D., Perez, J. E., Veltkamp, C. J. (1993). Pheromone disseminating structures in tergites of male phlebotomines (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of entomological research*, 83(3), 437-445.
- Ward, R. D., Morton, I. E., Brazil, R. P., Trumper, S., Falcão, A. L. (1990). Preliminary laboratory and field trials of a heated pheromone trap for the sandfly *lutzomyia logipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(4), 445-452.
- Werneck, G. L., Costa, C. H., de Carvalho, F. A. A., e Cruz, M. D. S. P., Maguire, J. H., Castro, M. C. (2014). Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the incidence of *Leishmania infantum* infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(10), e3172.
- Ximenes, M. D. F. F. D., Souza, M. D. F. D., Guilherme Castellón, E. (1999). Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(4), 427-432
- Zanet, S., Sposimo, P., Trisciuglio, A., Giannini, F., Strumia, F., Ferroglio, E. (2014). Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. *Veterinary parasitology*, 199(3-4), 247-249.
- Zer, R., Yaroslavski, I., Rosen, L., Warburg, A., (2001). Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International journal for parasitology*, 31(8), 810-814.
- Zhioua, E., Moureau, G., Chelbi, I., Ninove, L., Bichaud, L., Derbali, M., De Lamballerie, X. (2010). Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *Journal of General Virology*, 91(5), 1275-1283.

