

Distribución espacial y temporal de dípteros flebotominos vectores de *Leishmania infantum*, en ecosistemas rurales de la región de Murcia

J. Risueño¹, C. Muñoz¹, E. Goyena¹, P. Pérez-Cutillas², M. González¹, J. Ortiz¹, B. Alten³, E. Berriatua¹

¹ Sanidad Animal, Universidad de Murcia, Spain.

² Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia, Spain,

³ Ecology department, Hacettepe University, Ankara, Turkey

1. Introducción

Los dípteros flebotominos o flebotomos, son insectos de las zonas cálidas del planeta incluida la Cuenca Mediterránea, que transmiten el protozoo *Leishmania* spp., el agente causal de la leishmaniosis canina y humana. Existen más 800 especies de flebotomos en el mundo y en España se han descrito doce especies de las cuales solo *Phlebotomus ariasi* y *P. perniciosus* tienen actividad vectorial de la única especie de *Leishmania* endémica en nuestro país, *Leishmania infantum* (Ready, 2013; ; Martínez-Ortega y Gallego., 1987)

Sin embargo, estudios recientes demuestran que la epidemiología de la leishmaniosis y la ecología de los flebotomos en Europa está cambiando; su distribución geográfica se ha extendido a latitudes más septentrionales, hay epidemias leishmaniosis humana en zonas previamente indemnes, *L. infantum* se ha detectado por primera vez en numerosas especies de fauna silvestre (Millán *et al.*, 2014) y hay evidencia de la presencia en el sur de Europa de *L. major* procedente del norte de África, en el flebotomo *Sergentomya minuta* (Campino *et al.*, 2013). Las causas de la emergencia de *L. infantum* y sus vectores son poco claras y se piensa que estaría relacionado al menos en parte al impacto antropogénico en los espacios naturales y la modificación del paisaje, que cambia la dinámica de los agentes patógenos, los reservorios y los vectores (Hoyos-López *et al.*, 2016).

Con excepción de los estudios realizados en la década de 1980 por Martínez-Ortega (1985 y 1987) , no existen estudios actuales sobre la abundancia de flebotomos y hay poca información sobre las condiciones medioambientales que favorecen a la abundancia y la cría de los flebotomos (Killick-Kendrick, 1999). A diferencia de los mosquitos, éstos insectos depositan los huevos en zonas terrestres, protegidas de la luz solar directa y 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, en la base de arbustos y árboles, y en recovecos de ambientes humanizados como edificios en ruinas, casetas de aperos de labranza, vertederos y alcantarillas. Los machos se alimentan de azúcares vegetales y solo las hembras precisan tomar sangre para realizar la oviposición (killick-kendrick *et al.*, 1999) y por lo tanto solamente ellas transmiten el parásito. La sangre que necesitan sin embargo, la pueden tomar de cualquier especie y por ello los adultos tienden a concentrarse donde lo hacen los hospedadores como por ejemplo en las granjas de ganado.

Para la realización del estudio se dividió la Región de Murcia en 5 zonas geoclimáticamente distintas. Estudio de prevalencia de Leishmania en perros y personas en éstas zonas indicaro que la distribución de infectados es heterogénea (Pére-Cutillas et al. 2015). En el presente estudio se llevo a cabo un muestreo intensivo en la época de mayor actividad del vector en zonas rurales donde se conoce que la incidencia de leishmaniosis canina (Lcan) es elevada. Para ello se emplearon trampas de luz y adhesivas colocadas en granjas ovinas y colectivos caninos con el fin de identificar zonas donde la abundancia es maxima. Posteriormente se realizaron estudios comparativos entre los datos de abundancia obtenidos, los factores ambientales de cada zona y la incidencia de la enfermedad con intención de valorar el riesgo relativo en cuanto a densidad de flebotomos y elaborar un mapa regional de riesgo junto a los datos obtenidos anteriormente de Leishmaniosis.

2. Materiales y métodos

En este estudio se valoró la abundancia del vector en zonas rurales entre mayo y octubre 2015, en 25 granjas ovinas y colectivos caninos de Archivel, Jumilla-Yecla, Lorca, Murcia y Cartagena, poblaciones situadas a una media de 850m, 650m, 300m, 150m y 50m sobre el nivel del mar. En cada lugar se pusieron 8 trampas adhesivas y 1 trampa luminosa (trampa CDC) durante 24 horas cada 2 semanas en 8 ocasiones

Se emplearon trampas adhesivas consistentes en folios de papel DIN A4 impregnados en aceite de ricino sujetas con pinzas y expuestos a una o dos caras. Se colocaron en las paredes, agujeros, vayas, ventanales, etc. lugares representativos de cada edificio que pudiesen reunir las condiciones para el desarrollo del ciclo biológico del díptero ofuesen zonas de reposo o tránsito de los flebotomos adultos. Las trampas CDC se colocaron en el interior de los edificios proximas a los animales y a un termohigrómetro para registrar la temperatura (T°) y humedad relativa (HR). Se recabaron datos sobre las instalaciones y la densidad y uso de insecticidas en los animales.

En el momento de recogida, las trampas se archivaron entre dos folios A4 de papel dentro de carpetas rotuladas con la identificación de cada uno de los lugares, fecha de puesta, fecha de recogida y se mantuvieron en refrigeración a 4°C mientras que en las trampas CDC se rolutaron los recipientes que contenian los insectos con la identificación de cada lugar y se metieron en el congelador a -20 °C hasta su procesamiento. Para extraer los flebotomos adheridos al aceite de ricino y separarlos en los recipientes de las CDC se empleó un pincel mojado en etanol al 70% y se almacenaron en viales con etanol absoluto para biología molecular con etiquetas identificativas.

La identificación específica tanto de los machos como de las hembras se realizó con el microscopio óptico a 10X y 40X aumentos, siguiendo las claves de identificación de Gállego Berenguer y col. (1992), las claves taxonómicas de Lewis (1982), el cuaderno titulado "Morphological characteristics for sandfly taxonomy" del Dr. Shabaan El-Hossary (2006). Los machos se montaron en portaobjetos con líquido de Hoyer, manipulándolos con dos agujas entomológicas de 0,20mm en un estereomicroscopio hasta hacer visibles las estructuras de la genitalia empleadas para la especiación. En el caso de las hembras,

la identificación de los ejemplares se realizó directamente en la lupa binocular basándonos en la morfología de la cabeza y teniendo en cuenta la presencia de cibario armado como rasgo distintivo en la especie *Sergentomyia minuta*. Para el resto de las hembras, pertenecientes al género *Phlebotomus*, se examinó la morfología de las espermatecas. Para ello, primeramente se realizó la disección del abdomen a nivel del VIII segmento con agujas entomológicas y se procedió a su aclarado mediante solución de Marc-André al calor de un mechero durante 15 y 20 segundos.

3. Resultados

Durante la época de mayo y octubre 2015 se colocaron un total de 200 trampas CDC de las cuales se recuperaron 193 mientras que de trampas adhesivas se colocaron 1600 y se recogieron 1482. Se capturaron 3620 flebotomos de los cuales el 82% fue con trampas CDC. De ellas, 61% fueron positivas, con al menos 1 flebotomo. . Hasta la fecha se han montado y especiado 197 muestras pertenecientes al primer muestreo del estudio. La frecuencia de especies hallada fue *Phlebotomus perciniosus* (78 %), *P. papatasi* (13 %), *P. longicuspis* (3 %), *P. sergenti* (3 %), *P. ariasi* (2 %) y *Sergentomyia minuta* (2 %).

La abundancia de flebotomos varió significativamente según la zona y fue máxima en Archivel, seguido de Lorca y mínima en Cartagena. La abundancia pues, aumentó con la altitud excepto que en Jumilla-Yecla fue menor que en Lorca. Se observó además un aumento progresivo en la abundancia de flebotomos hasta alcanzar un máximo en la segunda semana de Julio. Este patrón se asoció a un incremento de la Tª ambiental y sobre todo a la HR (humedad relativa) en el lugar en el que se colocaron las trampas, siendo la abundancia máxima cuando la HR fue mínima. Por otro lado se observó una relación entre la abundancia de flebotomos y las características de los edificios en los que se colocaron las trampas, siendo máxima en edificios viejos de piedra con suelos de paja o tierra mientras que no se observó relación con las especies de animales, densidad de animales y ventilación.

4. Discusión

El estudio llevado a cabo demuestra que la distribución de flebotomos es heterogénea y está positivamente correlacionada con la prevalencia de Leishmania, excepto en la zona de Archivel dónde los datos de prevalencia de leishmania son escasos. Se observó una estrecha relación entre la abundancia de flebotomos y las variables medioambientales incluida la temperatura y humedad relativa.

El modo de crecimiento y desarrollo de los insectos puede depender de varios factores entre los que se incluyen el tipo y la cantidad de alimento disponible, la presencia de depredadores, así como factores abióticos como la humedad, la temperatura y la altitud, entre otros (Ballart *et al.*, 2014). La temperatura y humedad a la que se observó mayor abundancia de flebotomos fueron 22-27°C y 31-40mm, respectivamente. Estos datos se corresponden con con otros estudios.

La estrecha dependencia de la abundancia de flebotomos con la T^a y la HR se corresponde a la marcada estacionalidad encontrada. La actividad de los flebotomos en la región comenzó en mayo y terminó en octubre, con un pico muy elevado en julio. Éste pico se correspondería con el descrito en los estudios entomológicos realizados por Martínez-Ortega (1985 y 1987). Este autor describe un pico secundario en el mes de septiembre tras observar un descenso en la abundancia de flebotomos en agosto. En el presente estudio no fue posible recoger muestras durante este mes.

Según los resultados obtenidos en la Región de Murcia las zonas geográficas de Lorca y Archivel reúnen las condiciones óptimas ambientales necesarias para los flebotomos. Se sitúan a una altitud sobre el nivel del mar de 300m y 850m, respectivamente. Estudios en otros países demuestran una relación similar entre la abundancia de flebotomos y la altitud. La altitud no es un factor ecológico por sí mismo (Ozbel *et al.*, 2011) y está estrechamente relacionado con la T^a y la HR. Sorprendentemente la abundancia de flebotomos en la zona de Jumilla-Yecla fue comparativamente baja. Cabe esperar que además de la altitud, temperatura y HR, existan otros factores medioambientales que condicionan la abundancia de flebotomos. El viento, por ejemplo, podría influir ya que los flebotomos tienen una capacidad de vuelo limitada (Oliveira *et al.*, 2013; Ready, 2013).

La abundancia de flebotomos se relacionó también con las características del edificio. Siendo mayor en los edificios más antiguos y de piedra. Según los resultados obtenidos, este tipo de edificaciones: con gran cantidad de materia orgánica en el suelo, grietas y agujeros en las paredes, techados de madera y paja, animales en su interior podrían favorecer el asentamiento de flebotomos al disponer de lugares de cría, reposo y alimento. La falta de conocimientos sobre los lugares de reposo y cría impide el establecimiento de medidas de control frente a adultos y estadios inmaduros al aire libre (Elnaïem, 2011). El hecho de utilizar otro tipo de construcciones con superficies más lisas, fáciles de limpiar, de fácil mantenimiento y sobre las que se pudiera pulverizar insecticidas con acción residual podría resultar eficaz a la hora de controlar la abundancia de flebotomos en estas zonas rurales.

Dentro de los resultados obtenidos aparecen *P. perniciosus* (78%) y *P. ariasi* (2%), ambas vectoras de *L. infantum* en España existiendo una correlación con los datos anteriores de prevalencia de leishmaniosis (Pérez-Cutillas *et al.* 2015).

Referencias

Campino. L., Cortes S., Dionísio L., Neto L., Afonso M.O. , Maia C. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; 108(4):516-8.2013.

Gállego Berenguer J, Botet J, Gállego M, Portús M. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. *Public. de la Univ. de Córdoba* 1992;581-600.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. Imperial College at Silwood Park, Ascot, UK. 1999.

Lewis D.J.(1982) A taxonomic review of the genus *Phlebotomus*(Diptera:Psychodidae, *Phlebotomus*); Bulletin of the British Museum; *Entomology series*,2.

Martinez-Ortega,E y Gallego,E.C.(1987) Fenología de los flebotomos del subgénero Larrousius (Diptera:Psychodidae, *Phlebotomus*) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín Asoc.esp.Entom*,11,293-300.

Millán J., Ferroglio E., Solano-Gallego L. Role of wildlife in the epidemiology of Leishmania infantum infection in Europe. *Parasitol Res.* 2014 Jun;113(6):2005-14.

Ready P.D. (2013).Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.*,58,227-50.

Shabaan El-Hossary. Morphological characteristics for sandfly taxonomy. *Research and training center on vectors of diseases, Ain Shams University.* May 2006.

Hoyos-López R., Bolaños R., Contreras-Gutierrez M., Carrero-Sarmiento D. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a sub-Andean forest from the Norte de Santander, Colombia. *J Vector Borne Dis.* 2016 Jan-Mar;53(1):70-6.

Oliveira EF, dos Santos Fernandes CE, Araújo e Silva E, Brazil RP, de Oliveira AG. Climatic factors and population density of Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) in an urban endemic area of visceral leishmaniasis in midwest Brazil. *J Vector Ecol.* 2013 Dec;38(2):224-8

Ballart C, Guerrero I, Castells X, Barón S, Castillejo S, Alcover MM, Portús M, Gállego M. 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. *Geospat Health.* 2014 May;8(2):389-403.

Elnaiem DE. Ecology and control of the sand fly vectors of Leishmania donovani in East Africa, with special emphasis on *Phlebotomus orientalis*. *J Vector Ecol.* 2011 Mar;36 Suppl 1:S23-31

Pérez-Cutillas P, Goyena E, Chitimia L, De la Rúa P, Bernal LJ, Fisa R, Riera C, Iborra A, Murcia L, Segovia M, Berriatua E. Spatial distribution of human asymptomatic Leishmania infantum infection in southeast Spain: a study of environmental, demographic and social risk factors. *Acta Trop.* 2015 Jun;146:127-34.

Ozbel Y, Sanjoba C, Alten B, Asada M, Depaquit J, Matsumoto Y, Demir S, Siyambalagoda RR, Rajapakse RP, Matsumoto Y. Distribution and ecological aspects of sand fly (Diptera: Psychodidae) species in Sri Lanka. *J Vector Ecol.* 2011 Mar;36;1:S77-86.