



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## Estudios sobre la estructura y dinámica del foco de leishmaniosis del Priorat (Catalunya)

Roser Fisa Saladrigas



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIOS SOBRE LA ESTRUCTURA Y DINAMICA DEL  
FOCO DE LEISHMANIOSIS DEL PRIORAT (CATALUNYA)

ROSER FISA SALADRIGAS

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700082367

18

18

I N D I C E

I N D I C E

I. INTRODUCCION .....	16
I.1. FOCOS DE LEISHMANIOSIS DEL MEDITERRANEO OCCIDENTAL Y CENTRAL DE EUROPA .....	21
II.MOTIVACION, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	34
III. DESCRIPCION DE LA ZONA DE ESTUDIO .....	38
III.1.FISIOGRAFIA .....	39
III.1.1. SITUACION GEOGRAFICA .....	39
III.1.2. LOS SUELOS .....	42
III.1.3. LA RED HIDROGRAFICA .....	42
III.2.BIOCLIMA .....	44
III.2.1. EL CLIMA .....	44
III.2.2. LA VEGETACION .....	45
III.3.POBLACION .....	47
IV.ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA .....	50
IV.1. MATERIAL Y METODOS .....	51
IV.1.1. MUESTREO .....	52
IV.1.1.1.Elección del sistema de muestreo .....	52
IV.1.1.2. Población prospectada .....	53
IV.1.1.3. Identificación del animal .....	55
IV.1.2. DIAGNOSTICO .....	57
IV.1.2.1. Diagnóstico clínico .....	57
IV.1.2.2. Diagnóstico etiológico .....	58

A. Toma de muestra .....	58
B. Examen directo de la muestra .....	60
C. Cultivo de la muestra .....	61
D. Congelación de las cepas aisladas ....	64
IV.1.2.3. Diagnóstico inmunológico .....	65
IV.1.2.3.1. Muestras: sangre total y/o suero .....	65
A. Toma de muestra .....	65
B. Conservación de la muestra .....	65
C. Preparación de las muestras .....	66
IV.1.2.3.2. Técnicas serológicas utilizadas .....	68
A. Descripción de las técnicas .....	68
A.1. Técnica IFI .....	68
A.2 Técnica "Dot-ELISA" .....	72
B. Preparación del antígeno .....	79
IV.1.3. IDENTIFICACION DEL PARASITO .....	80
IV.1.3.1. Criterio de identificación y clasificación utilizado .....	80
IV.1.3.2. Nomenclatura .....	82
IV.1.3.3. Cepas estudiadas .....	83
IV.2. RESULTADOS .....	84
IV.2.1. PRESENTACION DEL CONJUNTO DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA POBLACION ESTUDIADA .....	85
IV.2.2. DIAGNOSTICO SEROLOGICO .....	130
IV.2.2.1. Elección del título diagnóstico "Dot-ELISA" .....	131
a) Comparación de los resultados serológicos "Dot-ELISA" con los resultados obtenidos por IFI .....	131
b) Comparación de los resultados serológicos "Dot-ELISA" con el diagnóstico etiológico .....	132
c) Elección del título diagnóstico	

mediante un método global .....	134
IV.2.2.2. Sensibilidad y especificidad "Dot-ELISA" ..	136
IV.2.3. RELACION DIAGNOSTICO SEROLOGICO "DOT-ELISA"- DIAGNOSTICO CLINICO-DIAGNOSTICO ETIOLOGICO .	137
IV.2.4. PREVALENCIA DE LA PARASITOSIS EN LA COMARCA .	139
IV.2.5. ESTUDIOS DE INCIDENCIA .....	140
IV.2.6. ESTUDIOS DE EVOLUCION DE LOS ANIMALES EN EL TIEMPO .....	140
IV.2.6.1. Evolución espontánea de los animales con títulos serológicos elevados .....	141
A. En el período de una año .....	141
A.1. Estudio serológico .....	141
A.2 Estudio clínico .....	143
B. En el período de varios años .....	145
IV.2.6.2. Evolución espontánea de los animales con títulos bajos poco significativos .....	146
A. Estudio serológico .....	146
B. Estudio clínico .....	148
IV.2.7. DISTRIBUCION DE LA LEISHMANIOSIS EN FUNCION DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACION CANINA .....	149
IV.2.7.1. Influencia de la edad .....	150
IV.2.7.2. Influencia del sexo .....	151
IV.2.7.3. Influencia de la longitud del pelo .....	153
IV.2.7.4. Influencia del peso y tamaño .....	154
IV.2.7.5. Influencia de la actividad .....	155
IV.2.8. DISTRIBUCION ESPACIAL DE LA LEISHMANIOSIS CANINA .....	156
IV.2.8.1. Distribución por localidades.....	156

A. Estudios de prevalencia .....	159
B. Estudios de incidencia .....	163
IV.2.8.2. Distribución por áreas .....	164
IV.2.8.3. Distribución altitudinal .....	166
IV.2.8.4. Distribución global .....	168
IV.2.9. IDENTIFICACION DEL PARASITO .....	168
IV.3. DISCUSION .....	171
IV.3.1. UTILIDAD E IDONEIDAD DE LA TECNICA	
"Dot-ELISA" .....	172
IV.3.2. RELACION SEROLOGIA-PATOLOGIA .....	174
IV.3.3. RELACION CULTIVO CON SEROLOGIA Y CLINICA ...	175
IV.3.4. PREVALENCIA E INCIDENCIA .....	176
IV.3.5. EVOLUCION CLINICO-SEROLOGICA .....	178
A. Evolución espontánea de los animales	
con serología elevada en el período	
de un año .....	178
B. Evolución espontánea de los animales	
con títulos bajos, poco significativos,	
durante un período aproximado	
de 6 meses .....	181
IV.3.6. INFLUENCIA DE LAS CARACTERISTICAS	
PROPIAS DEL ANIMAL .....	183
IV.3.7. DISTRIBUCION ESPACIAL DE LA LEISHMANIOSIS ..	186
IV.3.8. IDENTIFICACION DEL PARASITO .....	188
V. ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS EN OTROS RESERVORIOS:	
MICROMAMIFEROS, ZORROS, GANADO OVINO Y CAPRINO ....	191
V.1. MATERIAL Y METODOS .....	192

V.1.1.MUESTREO .....	193
V.1.1.1. Población prospectada .....	193
V.1.1.2. Identificación del animal .....	194
V.1.1.3. Sistema de muestreo .....	197
V.1.2.DIAGNOSTICO .....	197
V.1.2.1. Diagnóstico etiológico .....	197
A. Toma de muestra .....	198
B. Examen directo .....	199
C. Cultivo .....	199
D. Inoculación al hamster dorado .....	199
V.1.2.2. Diagnóstico inmunológico .....	200
A. Toma de muestra .....	200
B. Conservación de la muestra .....	201
C. Preparación de la muestra .....	202
D. Técnica serológica utilizada: "Dot-ELISA" .	202
- Reactividad de la proteína A frente	
a las especies estudiadas .....	203
V.2. RESULTADOS .....	204
V.2.1.MICROMAMIFEROS .....	205
V.2.2.OTROS MAMIFEROS .....	206
V.3. DISCUSION .....	207
V.3.1.ORIENTACION DE LA BUSQUEDA .....	208
V.3.2.ESTUDIO DE LOS MICROMAMIFEROS Y MAMIFEROS	
DE LA COMARCA .....	209
V.3.2.1. Micromamíferos .....	210
V.3.2.2. Zorros .....	211
V.3.2.3. Cabras y ovejas .....	213

VI. ESTUDIO DEL VECTOR: LOS FLEBOTOMOS .....	215
VI.1. MATERIAL Y METODOS .....	216
VI.1.1. MUESTREO .....	217
VI.1.1.1. Elección de las zonas de muestreo .....	217
VI.1.1.2. Descripción de las zonas prospectadas .....	217
VI.1.2. METODOLOGIA .....	221
A. Sistema de captura .....	224
B. Recolección, fijación y montaje .....	225
VI.1.3. IDENTIFICACION .....	226
VI.2. RESULTADOS .....	229
VI.2.1. ANALISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS .....	230
VI.2.2. DISTRIBUCION DE LOS FLEBOTOMOS .....	233
VI.2.2.1. En las estaciones prospectadas .....	233
VI.2.2.2. Según su proximidad al hábitat humano .....	237
VI.2.2.3. Por áreas (100Km <sup>2</sup> ) .....	238
VI.2.2.4. Por altitudes .....	239
VI.3. DISCUSION .....	242
VI.3.1. ANALISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS .....	242
VI.3.2. DISTRIBUCION DE LOS FLEBOTOMOS EN EL ESPACIO..	246
VII. DISCUSION GENERAL .....	249
VIII. CONCLUSIONES .....	257
IX. BIBLIOGRAFIA .....	264
X. ANEXO .....	293

TABLAS

Tabla 1. Zimodemas hallados en los focos del Mediterráneo Occidental y Central de Europa, según nomenclatura del Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier.

Tabla 2. Estructura de algunos focos leishmaniósicos del Mediterráneo. Agente etiológico *L.infantum*.

Tabla 3. Distribución de la población humana en la comarca del Priorato según la altitud.

Tabla 4. Localidades estudiadas en la comarca del Priorato.

Tabla 5. Distribución temporal de los animales analizados.

Tabla 6. Reactividad de la Proteína A frente a las inmunoglobulinas de diferentes especies animales.

Tabla 7. Sistemas enzimáticos estudiados.

Tabla 8. Cepas de *Leishmania*, de procedencia canina, aisladas y tipificadas en la comarca del Priorato.

Tabla 9. Presentación del conjunto de resultados obtenidos de los perros estudiados.

Tabla 10. Resultados serológicos obtenidos del conjunto de muestras estudiadas al aplicar la técnica IFI y la técnica "Dot-ELISA".

Tabla 11. Relación entre los títulos serológicos "Dot-ELISA" hallados y los cultivos ganglionares realizados.

Tabla 12. Resultados serológicos "Dot-ELISA", sintomatología y resultados de los cultivos.

Tabla 13. Distribución de los animales según sus títulos serológicos.

Tabla 14. Evolución serológica en el período de un año.

Tabla 15. Evolución clínica en el período de un año.

Tabla 16. Variación de las tasas de anticuerpos en animales con títulos serológicos bajos durante el período de control.

Tabla 17. Evolución serológica de los animales con título inicial 1/400 durante el período de control.

Tabla 18. Evolución clínica de los animales con título serológico bajo en la primera determinación, durante el período de control.

Tabla 19. Prevalencia de la enfermedad según la edad del animal.

Tabla 20. Influencia del sexo según los grupos de edad.

Tabla 21. Prevalencia de la enfermedad según la longitud del pelo.

Tabla 22. Prevalencia de la enfermedad según el peso del animal.

Tabla 23. Prevalencia de la enfermedad según la actividad del animal.

Tabla 24. Resultados serológicos "Dot-ELISA" e IFI por localidades y año.

Tabla 25. Resumen de los resultados serológicos, expresados en prevalencia y TGM, por población y año.

Tabla 26. Incidencia de la leishmaniosis en diversas localidades de la comarca.

Tabla 27. Distribución de la leishmaniosis canina en la comarca por áreas (100Km<sup>2</sup>).

Tabla 28. Distribución de la leishmaniosis canina en la comarca según las distintas altitudes.

Tabla 29. Perfiles enzimáticos de los zimodemas identificados en el perro.

Tabla 30. Caracterización enzimática de las cepas aisladas y su procedencia.

Tabla 31. Micromamíferos capturados en los biotopos prospectados.

Tabla 32. Estudios realizados sobre los micromamíferos.

Tabla 33. Títulos "Dot-ELISA" hallados en los zorros analizados.

Tabla 34. Análisis, por áreas, de los resultados serológicos de los zorros junto a los resultados indicativos de la endemia canina y de la presencia de las especies vectoras.

Tabla 35. Especies de flebotominos aisladas en la comarca.

Tabla 36. Análisis cuantitativo de los flebotominos capturados.

Tabla 37. Flebotominos capturados en las estaciones prospectadas.

Tabla 38. Distribución de las especies de flebotominos según el hábitat.

Tabla 39. Distribución de las especies de flebotominos por áreas (100km<sup>2</sup>).

Tabla 40. Distribución de las especies de flebotominos según los niveles altitudinales.

Tabla 41. Infestación natural en *P. perniciosus* y en *P. ariasi* en dos poblaciones del Priorato.

Tabla 42. Capturas de flebotomos realizadas en la población de Torroja del Priorat con ceptos luminosos.

Tabla 43. Leishmaniosis canina y sus vectores según las distintas áreas descritas (100Km<sup>2</sup>).

Tabla 44. Leishmaniosis canina y sus vectores según los distintos niveles altitudinales.

## FIGURAS

Fig.1. Espectro general de las leishmaniosis y evolución después de la inoculación natural de *Leishmania*.

Fig.2. Ciclos de Garnham.

Fig. 3. Estructura y límites de un foco.

Fig. 4. Funcionamiento hipotético de un foco.

Fig. 5. El Priorato. Comarca de la provincia de Tarragona.

Fig. 6. El Priorato. Estructura interna de la comarca y sus límites.

Fig.7. El Priorato. Red hidrográfica.

Fig. 8. Ficha modelo de los perros controlados.

Fig. 9. Comparación suero/sangre total mediante la técnica "Dot-ELISA".

Fig.10. Placa revelada de "Dot-ELISA".

Fig.11. Aparato Bio-DOT utilizado.

Fig.12. Resultados serológicos de 70 muestras estudiadas por "Dot-ELISA" e IFI en paralelo.

Fig.13. Resultados serológicos "Dot-ELISA" de los perros estudiados considerando los resultados serológicos de cada año.

Fig.14. Resultados serológicos IFI de los perros estudiados, considerando los resultados serológicos de cada año.

Fig.15. Sensibilidad "Dot-ELISA".

Fig.16. Evolución serológica en el período de un año.

Fig.17. Evolución clínica esquemática de la población canina positiva (títulos de anticuerpos  $\geq 1/800$  y/o cultivo positivo), de acuerdo con los resultados obtenidos.

Fig.18. Evolución serológica en el período de 6 meses.

Fig.19. Prevalencia de la leishmaniosis canina según grupos de edad.

Fig.20. Prevalencia de la leishmaniosis canina según el sexo.

Fig.21. Prevalencia de la leishmaniosis canina según el sexo en las distintas edades.

Fig.22. Distribución de la leishmaniosis canina en la comarca según los valores de prevalencia hallados en las localidades estudiadas.

Fig.23. Distribución de la leishmaniosis canina en la comarca según los valores de TGM detectados en las localidades estudiadas.

Fig.24. Leishmaniosis canina en la comarca según los valores de prevalencia y TGM detectados en las áreas descritas (100Km<sup>2</sup>).

Fig.25. Leishmaniosis canina expresada en prevalencia según la altitud.

Fig.26. Leishmaniosis canina expresada en TGM según la altitud.

Fig.27. Evolución clínica esquemática de la población canina positiva (títulos de anticuerpos  $>1/800$  y/o cultivo positivo), de acuerdo con los resultados obtenidos.

Fig.28. Ficha de identificación de los micromamíferos capturados.

Fig.29. Estaciones prospectadas en la comarca del Priorato.

Fig.30. Claves de identificación de los flebotominos.

Fig.31. Distribución de *P. perniciosus* en la comarca según las densidades halladas en las estaciones prospectadas.

Fig.32. Distribución de *P. ariasi* en la comarca según las densidades halladas en las estaciones prospectadas.

Fig.33. Densidad de *P. perniciosus* detectada en los distintos estratos altitudinales muestreados.

Fig.34. Densidad de *P. ariasi* detectada en los distintos estratos altitudinales muestreados.

Fig.35. Leishmaniosis canina y sus vectores según los distintos niveles altitudinales

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A	Abundancia
D	Densidad
F	Frecuencia
G	Ganglio poplíteo
L	Lesión cutánea
LC	Leishmaniosis cutánea
LMC	Leishmaniosis mucocutánea
LV	Leishmaniosis visceral
LEM	Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier
M.O.	Médula ósea
MON	Montpellier
TGM	Media geométrica de la inversa de los títulos serológicos
TS	Tampón tris-salino
TST	Tampón tris-salino-tween
P	Prevalencia
PBS	Tampón fosfato

I. I N T R O D U C C I O N

## I. INTRODUCCION

Las leishmaniosis son las infestaciones causadas por los flagelados kinetoplástidos del género *Leishmania*. Su distribución es cosmopolita, estando únicamente ausentes en Australia y la Antártida y presentando elevada morbilidad en muchas zonas endémicas. No hay datos fidedignos sobre su incidencia mundial, pero se considera que hay unos 12 millones de casos humanos, con 400.000 casos nuevos cada año (O.M.S., 1984). Por ello, en 1976 fue incluida por la Organización Mundial de la Salud entre las seis enfermedades de estudio prioritario dentro de su programa "Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases".

El término leishmaniosis abarca una gran variedad de síndromes, producidos por diversas especies del género *Leishmania*, que afectan distintas poblaciones y se relacionan con vectores y reservorios animales determinados. El espectro clínico que produce es muy amplio, desde infecciones asintomáticas (Pampiglione y col., 1974b; Ho y col., 1982; Bettini y col., 1983; Badaró y col., 1986b; Badaró y col., 1986c) hasta infecciones graves que pueden llevar a la muerte, en ausencia de tratamiento específico. Es clásico distinguir entre leishmaniosis cutáneas, leishmaniosis mucocutáneas y leishmaniosis viscerales, y relacionarlas en principio con especies concretas, aunque es cada vez más evidente que existen comportamientos dispares, que podrían atribuirse a cepas con diferentes tropismos dentro de una misma especie, así como a la respuesta inmunitaria del hospedador (Molyneux y Ashford, 1983; Alvar, 1990a; Gradoni y col., 1990). En la Fig.1 se refleja el espectro general de las leishmaniosis y sus vías posibles de evolución, según Molyneux y Ashford, 1983.

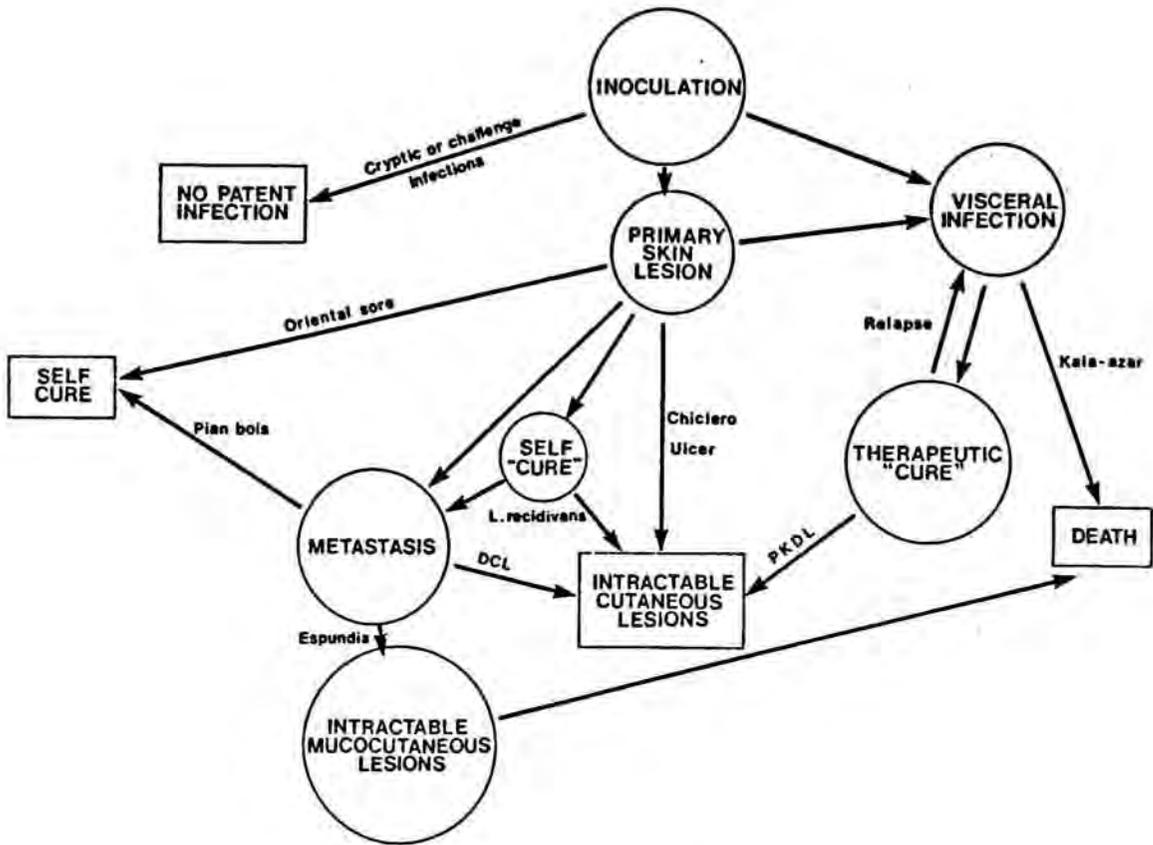


Fig.1. Espectro general de las leishmaniosis y evolución después de la inoculación natural de *Leishmania*. Cada especie puede producir una parte de esta secuencia y la mayoría de las vías evolutivas pueden ser adoptadas por más de una especie parásita. Las enfermedades mostradas son sólo ejemplos. DCL= leishmaniosis cutánea difusa; PKDL= leishmaniosis dérmica post-Kala-azar.

(Tomado de Molyneux, D.H. y Ashford. R.W., 1983)

Las leishmaniosis evolucionan dentro de zonas o territorios limitados llamados "focos naturales de infección", término introducido por los epidemiólogos rusos (Pavlovsky, 1966). Garnham en 1965, partiendo del estudio de la ecología de los diferentes tipos y focos naturales de leishmaniosis, expuso una teoría que explica la evolución de los tipos fundamentales de leishmaniosis (Fig.2): "Tipo Primario o enzoótico", donde el reservorio es un vertebrado salvaje (carnívoros y/o roedores fundamentalmente); "Tipo Secundario o zooantroponótico", donde un vertebrado doméstico sustituye al reservorio precedente; y "Tipo Terciario o antroponótico", cuando el reservorio desaparece y el hombre se presenta como el único hospedador vertebrado, en un ciclo antroponótico (hombre-vector-hombre), tal y como sucede en las leishmaniosis viscerales ocasionadas por *L.donovani* en la India y Zonas Meridionales de China.

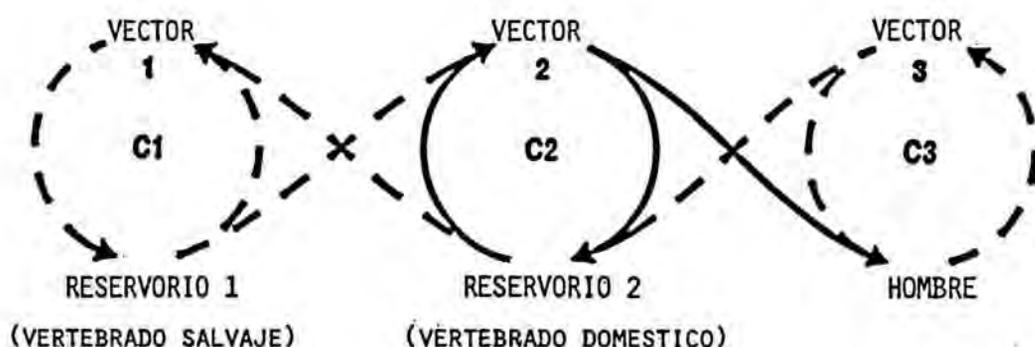


Fig.2. Ciclos de Garnham  
(Tomado de Rioux y col., 1977)

En Europa su distribución se limita a los países meridionales. Las cifras de morbilidad permanecen estables (Quilici y col., 1989), comportándose como una enfermedad hipoendémica, destacando un brote epidémico de leishmaniosis visceral, con decenas de muertos, en 1971-1972 en el Norte de Italia (Pampiglione y col., 1974a). Encuestas epidemiológicas, llevadas a cabo mediante pruebas serológicas y de hipersensibilidad retardada, realizadas en Francia e Italia revelan, sin embargo, la presencia de leishmaniosis crípticas, asintomáticas o silentes en su expresión clínica (Pampiglione y col., 1974b; Pampiglione y col., 1975; Bettini y col., 1983; Rioux y col., 1985; Gramiccia y col., 1990), pudiendo considerarse los casos sintomáticos solamente como una parte de las infecciones existentes en la realidad. Estos hechos podrían explicar la morbilidad aumentada que se detecta en los pacientes con factores de riesgo: malnutrición (Mansueto, 1981a; Bettini y col., 1983; Harrison y col., 1986; Cerf y col., 1987), enfermedades infecciosas concomitantes e inmunodeficiencias (Ma y col., 1979; Bettini y col., 1983; Badaró y col., 1986a; Antunes y col., 1987; Alvar y col., 1987a; Alvar y col., 1989b; Fernández Guerrero y col., 1987; Marty y col., 1989; Montalban y col., 1989; Altés y col., 1991).

En España es Enfermedad de Declaración Obligatoria desde febrero de 1982, por lo que a partir de esta fecha se poseen estadísticas oficiales. Es de sospechar que la subdeclaración es importante, fundamentalmente en los casos de leishmaniosis cutánea. La incidencia, de acuerdo con los Boletines Epidemiológicos Semanales del Ministerio de Sanidad y Consumo (1982-1988), es de aproximadamente 0.3 casos cada 100.000 habitantes. En Cataluña, teniendo en cuenta los datos recogidos en el Butlletí Epidemiològic de Catalunya (Generalitat de Catalunya, 1982-1988), la tasa de incidencia es ligeramente superior, situándose alrededor del 0.7 (casos por 100.000 habitantes).

### I.1. FOCOS DE LEISHMANIOSIS DEL MEDITERRANEO OCCIDENTAL Y CENTRAL DE EUROPA.

Parecen incluirse entre los focos de "Tipo Secundario" descritos por Garnham, en los cuales el perro actuaría como hospedador habitual (Rioux y col., 1968a) y el hombre como una "víctima" accidental (Garnham, 1965) de la afección animal, actuando tan solo como "indicador" (Rioux y col., 1970). El hallazgo de otros hospedadores salvajes en estas zonas (rata y zorro) cuestiona la posible coexistencia de varios hospedadores en un mismo foco en un ciclo de "Tipo Primo-Secundario" en el que intervienen el reservorio primitivo salvaje y el reservorio doméstico, o si por el contrario éstos actúan meramente como reservorios ocasionales (Rioux y col., 1968a).

Todas las cepas aisladas corresponden al complejo *L.infantum* Nicolle, 1908 (Maazoun y col., 1981a; Gradoni y col., 1984; Gradoni y col., 1986a; Moreno, 1989; Alvar y col., 1990b), por lo que se considera el complejo responsable de la leishmaniosis visceral y canina, así como el único responsable, hasta el momento identificado, de la leishmaniosis cutánea. Es de destacar, sin embargo, el hallazgo de tres cepas en Italia (en dos perros y un zorro) que se revelan más próximas a las cepas aisladas en el Este de Africa, Sudán y Etiopía que a las habituales en el Mediterráneo Occidental (Gramiccia y col., 1982a; Moreno y col., 1984; Moreno, 1989).

Los vectores incriminados son flebotomos, pertenecientes todos al subgénero *Larrousius* Nitzulescu, 1931 (Killick-Kendrick, 1990a). La idea clásica que considera, en el Viejo Mundo, una especie dominante o única en cada foco (Killick-Kendrick, 1979), es actualmente discutida ante la posibilidad de coexistencia de al menos dos especies igualmente implicadas en la transmisión (Rioux y col., 1986a; Lucientes y col.,

1988).

El estudio de un foco leishmaniósico debe conjugar el estudio integrado de todos los miembros que lo conforman, indispensable para llegar a conocer cómo circula el parásito y cómo se produce la contaminación humana. Para ello, es imprescindible identificar el parásito responsable y conocer cuáles son sus reservorios y vectores eficaces.

### El parásito

Los nuevos criterios bioquímicos de identificación del parásito (Lainson y Shaw, 1987), entre ellos el análisis electroforético de los isoenzimas, han permitido diferenciar los grandes complejos de especies (Lanotte y col., 1981; Moreno, 1989; Maazoun y col., 1981a; Maazoun y col., 1986; Le Blancq y col., 1986a; Le Blancq y Peters, 1986b; ; Le Blancq y col., 1987; Rioux y col., 1990), así como poner de manifiesto la gran variedad de cepas que los conforman (Maazoun y col., 1981a; Moreno, 1989).

La caracterización isoenzimática de las cepas aisladas en esta zona del Mediterráneo ha demostrado la existencia de diversos zimodemas, algunos con tropismos marcados (cepas dermatropas y cepas viscerotropas) (Rioux y col., 1985; Gállego y Portús, 1986). Sin embargo, debe indicarse que en la evolución de la parasitosis no tan solo interviene la naturaleza del parásito sino también la respuesta celular del hospedador (Alvar y col., 1989b). De hecho, se ha observado que cepas consideradas dermatropas han visceralizado en pacientes inmunocomprometidos (SIDA, etc.), lo que corrobora la importancia de la respuesta inmune celular (Olivier y col., 1989; Bogdan y col., 1990; Locksley y Scott, 1991) en el progreso de la enfermedad (Portús y col., 1989; Alvar, 1988; Condom y col., 1989; Gradoni y col., 1990; Jiménez y col.,

1991).

Los zimodemas hallados, según nomenclatura del Laboratoire d'Ecologie Medicale et Pathologie Parasitaire de la Facultad de Medicina de Montpellier, centro de referencia para la identificación enzimática de *Leishmania*, y de acuerdo con los hospedadores de los que han sido aislados y la afección causada, se resumen en la Tabla 1 (Rioux y col., 1980; Rioux y col., 1984; Rioux y col., 1985; Rioux y col., 1986a; Rioux y col., 1986b; Maazoun y col., 1981a; Gramiccia y col., 1982a; Gramiccia y col., 1982b; Belazzoug y col., 1985; Belazzoug, 1986b; Abranches y col., 1986; Moreno y col., 1984; Moreno, 1989; Gradoni y col., 1987a; Gállego y Portús, 1986; Portús y col., 1986; Portús y col., 1989; Alvar y Ortiz, 1987b; Alvar, 1988; Alvar y Benito, 1989a; Pratlong y col., 1989a; Pratlong y col., 1989b; Angelici y col., 1989; Jiménez y col., 1991; Campino y col., 1991).

ZIMODEMAS AISLADOS (MON)		
Hombre	LC	1, 11, 24, 29, 33, 34, 78*, 80*
	LV	1, 27, 28, 29, 33, 34*, 72, 80
Perro		1, 77, 82, 105
Zorro		1, 82
Rata		1
Flebotomo		1, 29, 77, 105 †

\*Zimodemas hallados únicamente en Malta o Argelia

†Infestación experimental

Tabla 1. Zimodemas hallados en los focos del Mediterráneo Occidental y Central de Europa, según nomenclatura del Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier.

Los zimodemas MON-11, MON-24, MON-29 y MON-33 parecen corresponder a cepas con tropismo cutáneo. Sin embargo, MON-29 y MON-33 han sido también aislados en enfermos de SIDA como causantes de leishmaniosis viscerales o mucocutáneas, debido seguramente al estado de anergia inmunitaria en la que se encuentran estos enfermos que permite la diseminación del parásito hacia las vísceras (Portús y col., 1989; Alvar, 1988; Jiménez y col., 1991).

La identificación del parásito es fundamental para llegar a conocer el funcionamiento de un foco, ya que permite discernir cuáles son los verdaderos reservorios y vectores de las *Leishmania* que afectan al hombre. Al lado de focos donde el agente causal aislado pertenece a un solo zimodema (Abranches y col., 1986), se encuentran focos leishmaniósicos donde coexisten diversos zimodemas en condiciones simpátricas (mismo foco) y/o sintópicas (mismo vector y/o mismo reservorio), por lo que resulta necesario conocer su papel en el hombre, en el reservorio y en el vector (Portús y col., 1986; Rioux y col., 1986a).

### El reservorio

El perro es considerado el hospedador vertebrado habitual de *L.infantum*, que se comporta como el principal responsable del mantenimiento de la enfermedad. Para conocer cuál es la importancia de la enzootía en un foco, es fundamental estudiar la frecuencia con la que se presenta la enfermedad en el animal, observando la prevalencia de la infección, así como la incidencia de nuevos casos, que revelan la actividad del foco. Además son de gran importancia, para conocer cómo se mantiene la enzootía, los estudios de la evolución clínica y serológica de los animales afectados (Fisa y col., 1990b) y de su capacidad de infestar al flebotomo vector.

El hallazgo de otros animales parasitados, roedores y cánidos salvajes, como la rata (Petrovic y col., 1975; Bettini y col., 1980; Morillas y col., 1985a) y el zorro (Rioux y col., 1968a; Bettini y col., 1980, Marín Iniesta y col., 1982; Abranches y col., 1983a; Abranches y col., 1984; Alvar y col., 1990c), parece indicar la presencia de otros posibles reservorios, siendo su papel fuente actual de controversia.

Según Killick-Kendrick (1987), para poder considerar un animal como reservorio, en un foco determinado, éste debe cumplir varios requisitos:

- 1- Ser portador del parásito. Deben aislarse repetidas veces del animal las mismas cepas de *Leishmania* que se encuentran en los pacientes.
- 2- Tener contacto con el vector. El reservorio debe ser una de las fuentes más importantes de alimentación del vector.
- 3- Presentar correctamente el parásito al vector. La infección en el animal reservorio debe cursar de tal forma que el parásito sea fácilmente asequible a la picadura del vector.

#### El vector

El papel vector corre a cargo de flebotomos pertenecientes al subgénero *Larroussius* Nitzulescu, 1931 (Killick-Kendrick, 1990a). Las especies consideradas vectores capaces de transmitir *L.infantum* en esta zona son:

- *P.ariasii* Tonnoir, 1921
- *P.perniciosus* Newstead, 1911
- *P.perfiliewi* Parrot, 1930

El vector se considera que actúa como el elemento limitante de un foco (Rioux y col., 1977; Safyanova, 1977; Leger, 1977), aunque su distribución pueda ser en ocasiones más amplia que la distribución de la enfermedad (Lewis, 1971; Lupascu y col., 1977; O.M.S., 1984). El estudio de las especies presentes, su distribución geográfica y altitudinal, sus hábitats (endofilia-exofilia), sus hábitos (endofagia-exofagia, antropofilia-zoofilia), su susceptibilidad y capacidad de transmitir las especies parásitas, junto con el conocimiento de su biología y fenología (ciclo gonotrófico, edad fisiológica, capacidad de entrar en diapausa, número de generaciones, etc.), su capacidad de vuelo, etc, permiten discernir cuales son las posibles especies vectoras en un foco y conocer su comportamiento particular.

El papel vector puede recaer en una especie o en más de una especie, como se ha observado en focos franceses (Moreno, 1989; Killick-Kendrick, 1990a), españoles (Rioux y col., 1986a; Lucientes y col., 1988) y portugueses (Pires, 1984), compartiendo el papel transmisor o comportándose uno de ellos como vector principal. Además, actualmente se conoce la existencia de variaciones intraespecíficas en las poblaciones de flebotomos que podrían influir en su capacidad vectorial (KK en Cevennes; Castillo Hernández y col., 1991).

Según Killick-Kendrick (1987), para ser considerada una especie como vector, deben cumplirse cuatro requisitos:

- 1- Hábitos alimenticios. El vector debe alimentarse sobre el hombre y sobre el reservorio.
- 2- Portador del parásito. El aislamiento repetido de infecciones naturales causadas por las mismas *Leishmania* encontradas en el hombre.

- 3- Distribución. La distribución del vector debe coincidir con la distribución de la infección en el hombre y en el reservorio.
- 4- Capacidad del vector de soportar el desarrollo del parásito y llegar a ser un transmisor eficiente.

El conocimiento profundo de los factores implicados: agente etiológico, reservorios y vectores, su interrelación y su relación con el entorno (Rioux y col., 1977; Leger, 1977; Moutou, 1983), permitirá entender como *Leishmania* logra circular y mantenerse en un foco, adaptándose a las condiciones del medio.

Rioux y col. (1977) proponen un modelo de funcionamiento de la leishmaniosis visceral en los focos del Mediterráneo, basándose en sus estudios realizados en el sur de Francia, fundamentalmente en las Cevennes, que se describe en las Figs. 3 y 4.

En la Tabla 2 se resumen algunos de los focos más importantes y mejor estudiados del área mediterránea. Estos datos muestran las distintas posibilidades de estructura y funcionamiento que presentan los focos del Mediterráneo e indican la independencia de cada uno de ellos en una zona geográfica limitada, como resulta patente en Toscana (Italia) donde se localizan dos focos separados tan solo por 50 Km (Monte Argentario y Baccinello) con características epidemiológicas bien distintas.

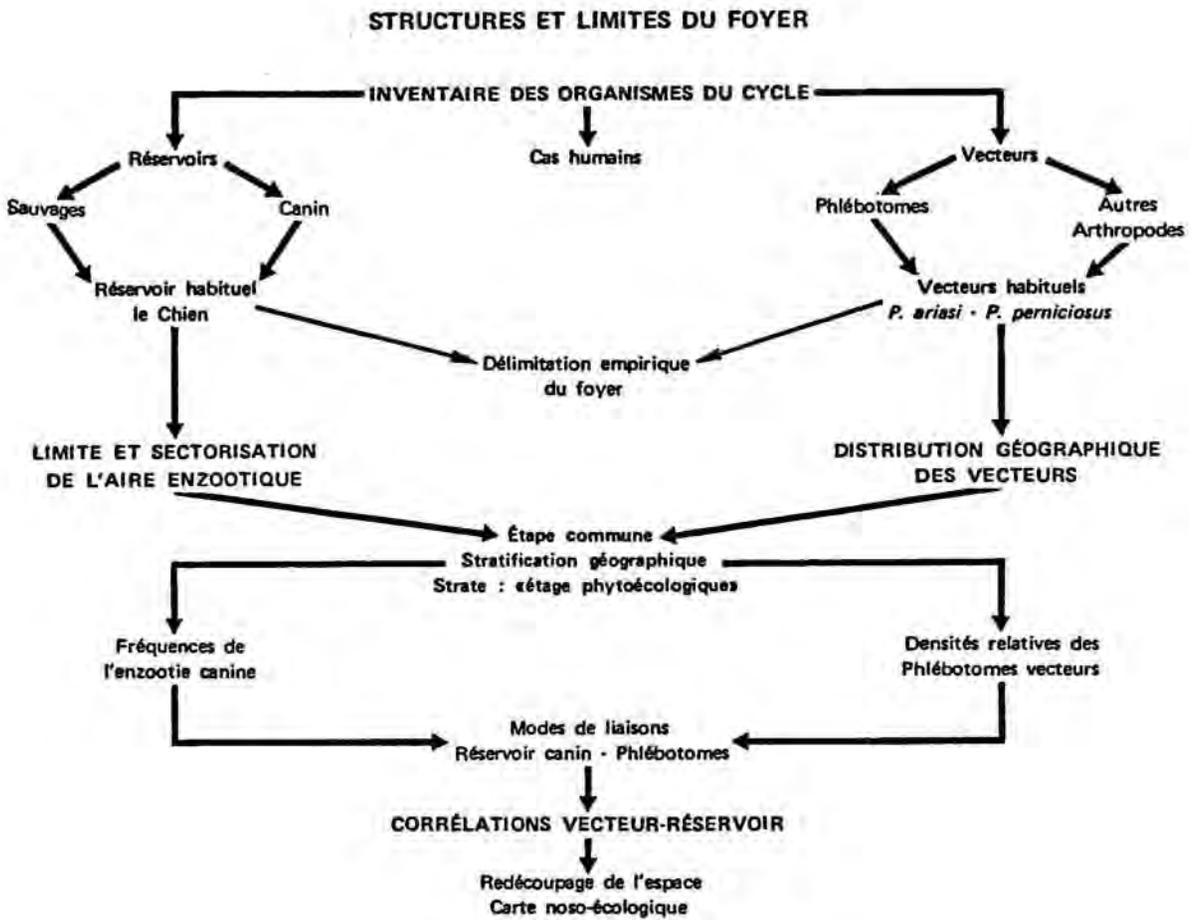


Fig. 3. Estructura y límites de un foco según Rioux y col. (Tomado de Rioux y col., 1977).

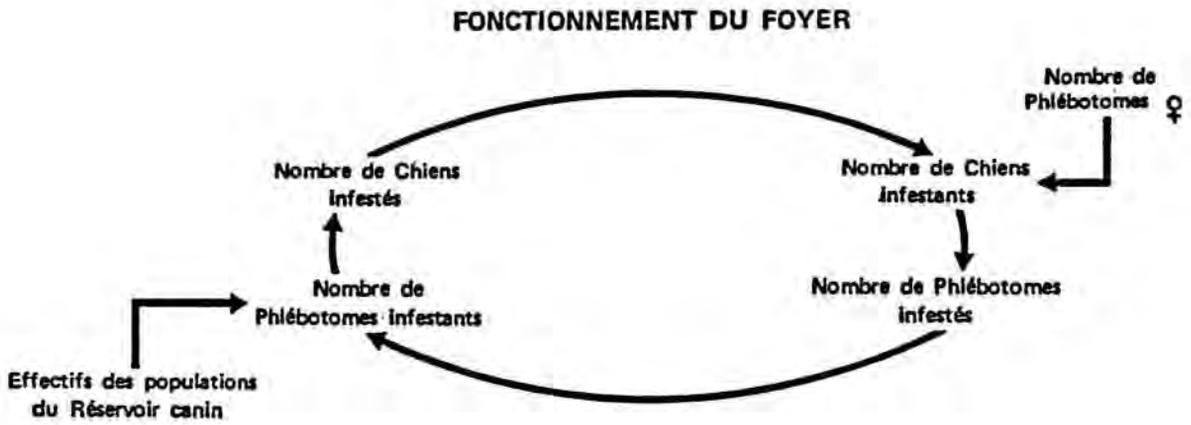


Fig. 4. Funcionamiento hipotético de un foco.  
(Tomado de Rioux y col., 1977)

Focos	Enf. Hombre Zimodema	Reservorio (P) Zimodema	Vector Zimodema	Referencias
<b>Italia</b>				
Baccinello	LV, LC	Perro (3.7%) MON-1, MON-82  Rata (3/143) MON-1  Zorro (1/33) MON-82	<i>P.perfiliewi</i> <i>P.perniciosus</i>	Bettini y col., 1983 Gramiccia y col., 1982a Gramiccia y col., 1982b Pozio y col., 1981b Gradoni y col., 1983 Bettini y col., 1980 Maroli y Bettini, 1977
-----				
Monte Argentario	LV	Perro (24%) MON-1, MON-27  Rata MON-1	<i>P.perniciosus</i> <i>P.perfiliewi</i>	Maroli y Bettini, 1977 Pozio y col., 1981b Gramiccia y col., 1982a Bettini y col., 1983 Moreno, 1989
<b>Francia</b>				
Languedoc Rousillon (Cevennes)	LV, LC, LMC MON-1, MON-29	Perro (3%) MON-1  Zorro (2/99)	<i>P.ariasii</i> MON-1  <i>P.perniciosus</i> MON-1	Rioux y col., 1968a Rioux y col., 1973 Rioux y col., 1984 Lanotte y col., 1980 Killick-Kendrick y Rioux, 1981 Moreno, 1989
-----				
Pirineos Orientales	LV, LC MON-1, MON-11 MON-29, MON-33	Perro (3.7%) MON-1	<i>P.ariasii</i> MON-29  <i>P.perniciosus</i>	Rioux y col., 1980 Rioux y col., 1985 Maazoun y col., 1981a Moreno, 1989

Focos	Enf. Hombre Zimodema	Reservorio (P) Zimodema	Vector Zimodema	Referencias
Provenza * Costa Azul	LV, LC MON-1	Perro (10%) MON-1	<i>P. perniciosus</i>	Ranque y col., 1977 Marty y col., 1986, Marty y col., 1988a Jambou y col., 1986 Moreno, 1989
Córcega	LV MON-1	Perro (6.7%) MON-1	<i>P. perniciosus</i>	Nicoli y Quilici, 1965 Rioux y col., 1972b Leger, 1977 Maazoun y col., 1981a Moreno, 1989
-----				
Portugal				
Arrábida (Lisboa)	LV,? MON-1	Perro (11.5%) MON-1	<i>P. perniciosus</i> i.n.	Abranches y col., 1983a Abranches y col., 1983b Abranches y col., 1984 Abranches y col., 1986 Pires, 1984 Moreno, 1989 González y col., 1987
		Zorro (6%) MON-1	<i>P. ariasi</i> i.n.	

Tabla 2. Estructura de algunos focos leishmaniósicos del Mediterráneo. Agente etiológico *L. infantum*. Zimodemas según nomenclatura del Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier.

\* Datos procedentes de distintos trabajos realizados en la zona sin que coincidan en el espacio ni en el tiempo.

(P) Prevalencia de la parasitosis

i.n. Infestación natural

II. MOTIVACION, OBJETIVOS Y  
PLAN DE TRABAJO

## II. MOTIVACION, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Después de algunos años en los que la leishmaniosis estuvo casi olvidada en nuestro país, en la pasada década se reemprendió su estudio por parte de diversos grupos de investigación, de tal manera que, en la actualidad, se están realizando esfuerzos importantes para su mejor conocimiento. En ello ha influido decisivamente el notable incremento que ha sufrido la prevalencia de la leishmaniosis canina en toda la región mediterránea y el carácter oportunista de la infección humana, consecuencia del cual la asociación SIDA-*Leishmania* es cada vez más frecuente. La inclusión por la O.M.S. de la leishmaniosis entre las enfermedades tropicales de estudio preferente ha propiciado la investigación fundamental, lo cual, junto a los avances tecnológicos, aplicables a los campos de la taxonomía y biología molecular, ha dotado a los estudios epidemiológicos de una especial efectividad. Todo ello permite un mejor conocimiento de la estructura y funcionamiento de los focos de leishmaniosis, que es fundamental tanto para comprender mejor su epidemiología como para establecer medidas de control adecuadas.

Incluido en este marco general del estudio de la leishmaniosis en el oeste mediterráneo, y dentro de programas de investigación nacionales e internacionales (CICYT, Cooperación hispano-francesa, CEE ), se están realizando en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Barcelona estudios sobre la eco-epidemiología y etio-patogenia de la leishmaniosis en Cataluña.

En esta línea se incluye nuestro trabajo sobre un foco localizado en la comarca del Priorat (Tarragona), donde estudios previos habían indicado su gran interés epidemiológico: plurivectorialidad intrafocal (Rioux y col., 1986a), coexistencia de diversos zimodemas en condiciones

simpátricas y/o sintópicas (Rioux y col., 1986a; Moreno, 1989) y el hallazgo de un zimodema, MON-29, de reservorio desconocido (Rioux y col., 1986a).

EL OBJETIVO principal del trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de la estructura y funcionamiento del foco a través del conocimiento de cada uno de los integrantes del ciclo:

- a) El parásito: caracterización bioquímica de las cepas circulantes.
- b) El vector: especies responsables de la vehiculación y su repartición espacial.
- c) El reservorio: la leishmaniosis canina: prevalencia, evolución clínica, y búsqueda de otros posibles reservorios.

y de la forma con que se relacionan entre sí.

Para ello se estableció el siguiente PLAN DE TRABAJO:

- Realización de encuestas serológicas de toda la población canina de la comarca mediante la técnica "Dot-ELISA".
- Observación clínica de los animales analizados para relacionar la clínica con la serología.
- Seguimiento periódico de algunos animales para observar su evolución clínico-serológica.

- Aislamiento de cepas de *Leishmania* de los animales seropositivos y su caracterización isoenzimática.
- Estudios serológicos en otras especies animales, posibles reservorios, especialmente reservorios sinantropos, y cultivo e inoculación animal de los seropositivos.
- Capturas de flebotomos mediante la técnica de los papeles adhesivos para determinar su distribución y densidad.

III. DESCRIPCION DE LA  
ZONA DE ESTUDIO

### III. DESCRIPCION DE LA ZONA DE ESTUDIO

#### III.1 FISIOGRAFIA

##### III.1.1. SITUACION GEOGRAFICA

(En Iglesias, J., 1974; Generalitat de Catalunya, 1981)

El Priorat es una comarca de la provincia de Tarragona (Fig.5), en la región mediterránea, con una extensión de 517.21 Km<sup>2</sup>, comprendida entre las coordenadas geográficas 0°43'- 1°0' longitud E y 41°4'- 41°20' latitud N.

Está formada por una depresión, que sigue el curso del río Siurana, formada por la Cordillera Prelitoral Catalana, que al llegar al Priorat se desdobra en una línea que, con el Montsant, prolonga su orientación de NE a SE, y otra que va hacia el mar separándola de la comarca del Baix Camp (Sierra de LLavanera, Sierra de Tivissa). La depresión formada queda abierta, hacia el oeste, a la comarca de la Ribera d'Ebre. El Priorat está pues constituido, por la depresión central y las montañas periféricas que lo conforman, lo que conlleva un desnivel de más de 1000 m.

Se distinguen tradicionalmente cuatro sectores diferenciados (Fig.6):

1. Priorat histórico, en la vertiente meridional del macizo del Montsant, actualmente ampliado a la zona de suelos esquistosos sobre pizarras paleozoicas, al que podemos denominar Priorat geológico. Comprende los municipios de: Poboleda, Porrera, Gratallops, La Morera, Torroja, Vilella Baixa, Vilella Alta, Bellmunt del Priorat, LLoà y parte del término de El Molar y Falset.

2. Bajo Priorat , considerada la zona que envuelve al núcleo central o Priorat geológico por el sur y el oeste, desde La Figuera hasta Pradell de la Teixeta, constituido por terrenos secundarios de granito, de naturaleza ácida, y terrenos calcáreos.
3. La zona del NO que limita con el Montsant, de terrenos triásicos y oligocénicos que comprende los municipios de Cabassers, La Bisbal de Falset y Margalef, y corresponde a una parte de las tierras de la antigua "Baronía de Cabassers".
4. La zona del NE entre la Sierra de Prades y del Montsant, de suelos esquistosos y calcáreos, que corresponde a las poblaciones de Arbolí, Cornudella y Ulldemolins, antiguamente conocido como la "Fossa de Cornudella-Ulldemolins".



Fig. 5. El Priorat : comarca de la provincia de Tarragona.



Fig. 6. El Priorat . Estructura interna de la comarca y sus límites.

### III.1.2. LOS SUELOS

(En Iglesias, J., 1974; Bolòs, O., de y Vigo, J., 1984)

La parte central (200 Km<sup>2</sup>) está constituida por esquistos pizarrosos del paleozoico, con suelos poco profundos, pedregosos y muy poco húmidos, de tipo ácido. Estos forman montañas negruzcas, redondeadas por el envejecimiento, que van perdiendo altura desde el este (Coll de l'Alforja, 922 m altitud) hacia el oeste (250 m-300 m altitud). En el norte se levanta el macizo del Montsant, formada por grandes bloques de conglomerados oligocénicos de suelos carbonatados (150 Km<sup>2</sup>). En el oeste, siguiendo el curso bajo del río Siurana, en los alrededores de Falset, aparecen suelos secundarios de granito de naturaleza ácida (30 Km<sup>2</sup>). Las montañas que lo envuelven, de naturaleza calcárea, generan suelos carbonatados, y representan 140 Km<sup>2</sup> de extensión.

### III.1.3. LA RED HIDROGRAFICA

(En Iglesias, J., 1974; Generalitat de Catalunya, 1981)

Los ríos principales son el Siurana, el Montsant y el Cortiella, todos ellos de caudal modesto (Fig. 7). El río Siurana y el Cortiella recorren la comarca de este a oeste, erosionando a su paso las pizarras paleozoicas de la zona central. El río Montsant presenta carácter más periférico, entre las montañas del Montsant y la Sierra de la Llena, que limita con la comarca de Les Garrigues. Hidrográficamente la comarca pertenece a la cuenca del río Siurana, que recoge las aguas del río Cortiella y Montsant para desembocar más tarde en el río Ebro.

Existen dos embalses, el de Siurana en el término de Cornudella, con una capacidad de 12 Hm<sup>3</sup>, que cede sus aguas a la comarca del Baix Camp, y el de Els Guiamets, en el

extremo sur de la comarca, con 10 Hm<sup>3</sup>, que posibilita el regadío en dos términos del Bajo Priorat (Els Guiamets y El Masroig).

Completando la red hidrográfica destacan las fuentes o minas, que son aguas subterráneas, utilizadas para el riego y para el consumo en los municipios.



Fig. 7. El Priorat . Red hidrográfica.

## III.2. BIOCLIMA

### III.2.1. EL CLIMA

(Bolòs, O., de, y Vigo, J., 1984; Molero, J., 1976)

Posee un bioclima xerótico claramente mediterráneo, según la definición de Gaussen, caracterizado por ser templado y seco. Las temperaturas son elevadas, con una media anual de 15°C (8°C en enero, el mes más frío; 24°C en agosto, el mes más cálido), que asciende a 16°C en el Bajo Priorat. Las precipitaciones anuales oscilan entre 500-600 ml anuales, sobrepasando los 600 ml en los sectores montañosos, con dos máximos en la primavera y el otoño, y una fuerte sequía en verano. Tan solo en las zonas más altas del Montsant llegan a imperar condiciones discretamente axeroméricas, de tipo submediterráneo, con un período hivernal más o menos largo y un período estival sub-húmedo o sub-árido.

Debido a su particular distribución geográfica, protegido por las montañas periféricas y abriéndose al oeste hacia la Depresión de Mora, recibe de esta zona influencias cálidas que se extienden por todo el Bajo Priorato. La zona norte situada entre El Montsant, las montañas de Prades y de l'Argenteria, recibe influencias más crudas, propias de estas altitudes. La zona del NO recibe además influencias del clima continental de Lleida penetrando por Margalef, y de la Ribera entrando por La Figuera y la Bisbal, proporcionando a esta zona unas características especiales de valle cerrado, de clima más húmedo y térmico gracias a fenómenos de inversión térmica.

### III.2.2. LA VEGETACION

(Molero, J., 1976; Bolòs, O., de y Vigo, J., 1984; Folch Guillen, R., 1986)

La vegetación es de carácter mediterráneo (submediterráneo) donde predominan, en condiciones naturales, el bosque de encinas y viburno (*Quercetum ilicis galloprovinciale*), que corresponde a la descripción de bosque esclerófilo típico. En la zona occidental, de clima más seco y continental, es substituido parcialmente por el carrascar o encinar continental más pobre (*Quercetum rotundifoliae*) y en las zonas altas y umbrías del Montsant aparece un bosque submediterráneo de roble valenciano y pino negro (*Violo-Quercetum fagineae*), y de pino rojo en las cumbres (*Violo Quercetum pinetosum sylvestris*).

Las encinas han sido suplantadas en muchas zonas por el bosque de pino blanco, que primitivamente se limitaba a terrenos abruptos y muy secos. La deforestación ha sido importante, provocando la aparición de extensas garrigas, sobre todo en los terrenos calcáreos.

Al conjunto de la comarca se le asignan 3625 hectáreas de pinos, 3392 hectáreas de bosques bajos, 2077 ha. de pastoreo y garrigas, 4409 ha. de espacios improductivos, 62 ha. de árboles de ribera y 312 ha. de bosque y garrigar en la zona del NE en Arbolí.

La vegetación de la comarca, de carácter mediterráneo, presenta pues una variabilidad remarcable, debido a su situación en una encrucijada de climas y por su diversidad litológica (calizas, granitos, esquistos, etc.). Se puede dividir la comarca en grandes fragmentos definidos por la influencia climática preponderante (territorio de influencia climática) (Molero, 1976):

- Territorio de influencia climática mediterráneo-marítima. Es el territorio bajo influencia del clima mediterráneo costero, que ocupa la franja de material granítico y pizarroso cerca del Baix Camp, la mayor parte del Priorat esquistoso y parte del Montsant Occidental, donde predomina el encinar (*Quercetum ilicis galloprovinciale*) y sus comunidades de degradación, y el pino blanco (*Pinus halepensis*).
- Territorio de influencia climática mediterráneo-continental, que comprende la zona norte del Priorat hasta las faldas meridio-occidentales del Montsant. La Sierra de la Llena, en la zona occidental, sirve de límite altitudinal frente a las influencias continental-estépicas que llegan de la comarca de Les Garrigues y de la Ribera d'Ebre. Sin embargo, los aires secos y tórridos penetran a través de las bajas altitudes y depresiones topográficas (La Figuera, La Granadella) y llegan hasta las faldas meridio-occidentales del Montsant.

Destaca la zona del NO, de Cabassers y Margalef, que posee un clima más húmedo y térmico a pesar de las influencias continentales, gracias a fenómenos de inversión térmica. La Bisbal de Falset aparece como la zona más seca por su proximidad a las tierras de Les Garrigues.

En las vertientes solanas predomina el carrascar (*Quercetum rotundifoliae*), junto con el encinar (*Quercetum ilicis galloprovinciale*), encontrándose también robledos (*Violo-Quercetum fagineae*) en las zonas más umbrías (*Q. faginea* y *Pinus nigra*).

Aparecen pequeños bosques de encina carrasca o encinar continental (*Q. rotundifoliae*) en puntos de la Sierra de la

Llena y del Montsant. En la zona de Ulldemolins aparece un bosque importante, gracias a las condiciones climáticas locales, influenciadas por la altitud y por los vientos secos y térmicos de Les Garrigues que chocan con los vientos fríos y húmedos que soplan de la zona de Prades.

- Territorio de influencia climática mediterráneo-montana. Situado en la zona alta y umbría del Montsant, con bosque sub-mediterráneo representado por dos asociaciones *Violo-Quercetum faginae*, que suele ocupar el piso inferior y que asciende a las cumbres acompañado del *P.silvestris* y el *Buxo-Quercetum pubescentis* en los barrancos más sombríos del Montsant, que reaparece en las vecinas montañas de Prades.

### III.3. LA POBLACION

(Iglesies, J., 1974; Gran Enciclopèdia Catalana, 1978; Generalitat de Catalunya, 1981)

El conjunto de la comarca ha experimentado una continua pérdida de población desde 1900, por el éxodo de sus habitantes hacia otras zonas, que provoca la aparición de una población envejecida. Se ha calculado una densidad de 23.52 h/Km<sup>2</sup> en 1970, con un porcentaje bajo de población diseminada del 0.86% (1970).

En Falset, la capital de la comarca, se encuentra el 22% del total de la población actual (más de 2500 h), y el resto distribuido en los municipios restantes. Aparte de Cornudella que casi alcanza los 1000 habitantes, la mayoría de los municipios poseen menos de 500 habitantes.

La población se concentra en la zona comprendida entre 250-500 m, que representa la mayor parte del Bajo Priorat y todo el Priorato histórico, distribuyéndose por altitudes como se indica en la Tabla 3.

Altitud (m)	Población (%)
100-250	21.40
250-500	60.00
500-700	15.50
Más de 700	3.10

Tabla 3. Distribución de la población en la comarca según la altitud en 1960. (En Iglesias, J., 1974)

IV. ESTUDIO DE LA  
LEISHMANIOSIS CANINA

**MATERIAL Y METODOS**

#### IV. ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

##### IV.1. MATERIAL Y METODOS

##### IV.1.1. MUESTREO

##### IV.1.1.1. Elección del sistema de muestreo

Al plantear el estudio epidemiológico de una enfermedad en una zona es importante la elección del sistema de muestreo, para conseguir unos resultados fiables. En nuestro caso, para conocer la prevalencia de la enfermedad en la población canina, se ha realizado una encuesta transversal, aplicando el método de "muestreo exhaustivo" en cada una de las localidades de la comarca, basado en el análisis de todos los individuos.

Teóricamente el estudio sería sobre todos los perros de la comarca, pero en la práctica siempre existe un cierto número que se escapa a la encuesta. Autores como Lanotte (1975) y Marty y col. (1986), al estudiar la repartición de la leishmaniosis, indican que la presencia de estos individuos no localizados no conduce a diferencias estadísticas apreciables.

Asimismo, para conocer la incidencia de la leishmaniosis en la población canina sana y la evolución de la enfermedad, se han realizado estudios longitudinales de seguimiento en diversas localidades durante varios años.

Las encuestas se han centrado en los municipios, aprovechando las campañas obligatorias de vacunación anti-rábica, donde debían acudir tanto los perros del municipio como los de los alrededores.

#### IV.1.1.2. Población prospectada.

Se han estudiado 1067 perros procedentes de 26 localidades de la comarca del Priorato (Tabla 4, Fig.6 pag.41 ), que acudieron a las diversas campañas de vacunación anti-rábica realizadas en estos municipios entre los años 1985-1990. En 335 perros se han realizado uno o varios controles serológicos posteriores, lo que representa un total de 1493 muestras analizadas (Tabla 5).

Localidad N° Nombre	Altura m	Censo Habit. N° (1986)	Perros anal. N°
1- Bellmunt	261	340	53
2- Cabassers	357	367	36
3- Capçanes	223	438	19
4- Ciurana	737	*	9
5- Cornudella	533	951	113
6- El Molar	228	348	51
7- Els Guiamets	226	305	33
8- Falset	363	2603	140
9- Gratallops	321	270	41
10-La Bisbal	373	311	20
11-La Figuera	575	141	20
12-La Morera	743	120	13
13-La Torre de F.	369	77	5
14-LLoà	219	169	15
15-Marçà	315	610	26
16-Margalef	378	165	22
17-Masroig	192	600	42
18-Poboleda	343	385	86
19-Porrera	316	474	77
20-Pradell T.	463	279	30
21-Scala Dei	470	**	14
22-Torroja	331	139	53
23-Ulldemolins	651	553	38
24-Vilella Alta	327	140	43
25-Vilella Baixa	214	195	33
26-La Venta P.	420	*	35
26 localidades			1067

Tabla 4. Localidades estudiadas en la comarca del Priorato ( 20.2 habitantes por km<sup>2</sup>, 99% población agrupada)

\* Depende administrativamente de Cornudella. Censo realizado conjuntamente

\*\* Depende administrativamente de La Morera. Censo realizado conjuntamente.

(En Caixa De Catalunya, 1989)

Localidad (N°)	A Ñ O S						En todo el período
	1985	1986	1987	1988	1989	1990	
Bellmunt 1					53(58)		53 (58)
Cabassers 2					30(31)	27(27)	36 (58)
Capçanes 3				18(18)	4 (5)		19 (23)
Ciurana 4					9 (9)		9 (9)
Cornudella 5	69(69)				41(45)	47(47)	113(161)
El Molar 6					43(48)	34(34)	51 (82)
Els Guiamets 7					33(43)		33 (43)
Falset 8				81(82)	43(50)	73(73)	140(205)
Gratallops 9				28(28)	18(18)		41 (46)
La Bisbal 10					20(20)		20 (20)
La Figuera 11					20(21)		20 (21)
La Morera 12				13(13)		9 (9)	13 (22)
La Torre F. 13					5 (5)		5 (5)
LLOà 14					15(21)		15 (21)
Marçà 15					26(29)		26 (29)
Margalef 16				15(15)		19(19)	22 (34)
Masroig 17					42(46)		42 (46)
Poboleda 18		60(60)		28(28)	36(39)		86(127)
Porrera 19				45(53)	11(16)	50(50)	77(119)
Pradell T. 20					30(32)		30 (32)
Scala Dei 21				11(11)	1 (1)	5 (5)	14 (17)
Torroja 22			32(32)	33(35)	32(34)	21(21)	53(122)
Ulldemolins 23					38(38)		38 (38)
Vilella A. 24		20(20)			23(23)		43 (43)
Vilella B. 25		16(16)			26(29)	22(22)	33 (67)
La Venta P. 26					28(34)	11(11)	35 (45)
	69(69)	96(96)	32(32)	272(283)	627(695)	318(318)	1067(1493)

Tabla 5. Distribución temporal de los animales analizados.

N°: número de la localidad

Número de perros (Número de muestras)

Han sido considerados como localidades, por sus características particulares, tres enclaves:

Ciurana y Scala Dei, que a pesar de formar parte de las poblaciones de Cornudella (N°5) y La Morera (N°12) respectivamente, han sido consideradas núcleos de población independientes por encontrarse a una distancia mayor de 2Km de los pueblos a los que pertenecen y a una altitud muy distinta.

La Venta del Pubill, donde se han englobado tres pequeños núcleos de población, dos caseríos convertidos en restaurantes (La Venta y Els Abellars) y un criadero de perros. Estos puntos situados muy próximos entre sí, (en un radio de 1Km), y bastante alejados de las poblaciones circundantes (Poboloda, Cornudella y Porrera), reunían un elevado número de perros. Por este motivo se consideró conveniente que se trataran como un grupo aparte.

#### IV.1.1.3. Identificación del animal

Los perros se han identificado mediante una ficha individual numerada donde constan sus principales características: edad, sexo, raza, aptitud, pelo, peso, lugar de origen, lugar de residencia y desplazamientos.

Se indica también la fecha del análisis, los resultados, el estado clínico, en especial los síntomas que pueden hacer sospechar una leishmaniosis, y toda la información que aporte el dueño del animal (Fig. 8).



UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA  
CATEDRA DE PARASITOLOGIA ANIMAL

DIAGNOSTIC IMMUNOLÒGIC DE LA LEISHMANIOSI CANINA

Reservat al veterinari

Reservat al Departament de Parasitologia

Nom del laboratori:

Número:

Número:

Títol IF:

Data d'extracció:

Data de recepció:

Data d'anàlisi:

Dades del gos

- Procedeix de consulta veterinària
- " " servei de zoonosi
- " d'enquestes rurals

Altres procedències:

- . Nom del gos: Raça:
- . Edat:  anys o  mesos o  cadell  Sexe: ♂
- adult  ♀
- senill

. Lloc de naixement :

. Propietari: \_\_\_\_\_

Telèfon: \_\_\_\_\_

. Lloc de residència:

. Desplaçaments accidentals i/o habituals (assenyali clarament els desplaçaments de gos durant els últims 2 anys):

. Activitat: caça  companyia  d'atura  guardià  altres.....

. Presenta algun procés patològic? si  no

- . Estat clínic actual: febre  depilació  anèmia
- onicogrifosi  astènia  pèrdua de pes
- ulceracions  adenopaties
- altres .....

. Tractament: Quin? .....

. Data d'aparició de la malaltia: primavera  tardor

estiu  hivern

. Serologia anterior: no  si  títol .....

. Cultiu: no  si  positiu  negatiu

Fig. 8. Ficha modelo de los animales controlados en el estudio

#### IV.1.2. DIAGNOSTICO

##### IV.1.2.1. Diagnóstico clínico

Se ha observado el estado clínico de los perros con especial referencia a las lesiones cutáneas. Son característicos los cuadros cutáneos de alopecia no prurítica simétrica y bilateral, con fuerte descamación, y los cuadros ulcerativos en cabeza y extremidades primordialmente (Ferrer y col., 1988). Al ser la leishmaniosis una infección generalizada, que afecta a diversos órganos generando procesos inflamatorios (bazo, médula ósea, riñón, hígado, suprarrenales, piel), puede presentarse bajo muy diferentes síntomas. Entre los principales o más indicativos cabe destacar: caquexia y anemia, fiebre, epistaxis, síndrome nefrótico o insuficiencia renal progresiva debido a una glomerulonefritis causada por depósitos de complejos inmunes formados en la circulación, lesiones cutáneas, queratoconjuntivitis, linfadenitis, hepatoesplenomegalia, artritis, onicogriposis, etc (Adler y Theodor, 1932; Sánchez Botija, 1947; Catarsini, 1981; Hernández Rodríguez y col., 1987; Bergeud, P., 1988; Cabassu y col., 1988; Nieto y col., 1990). Ante tal diversidad de síntomas distribuiremos los perros siguiendo el criterio utilizado por Mancianti y col. (1988a):

- 0 asintomáticos: completa ausencia de síntomas y signos referibles a una infección por *Leishmania*.
  
- + oligosintomáticos: adenopatía, pérdida de peso y/o pelo hirsuto.
  
- ++sintomáticos: cuando presentan todos o algunos de los signos severos de la enfermedad: alteraciones cutáneas (depilaciones, eczemas furfuráceos, úlceras), onicogriposis, queratoconjuntivitis, rigidez en las patas posteriores, etc.

#### IV.1.2.2. Diagnóstico etiológico

Basado en la observación del parásito, *Leishmania*, en su forma amastigota o promastigota, mediante examen directo o después de cultivo. Se ha utilizado para confirmar el diagnóstico en animales con serología positiva significativa.

#### A. Toma de muestra

Obtener una buena muestra es imprescindible para conseguir un diagnóstico fiable. En el perro leishmaniósico el parásito puede encontrarse en diversos órganos, pero con mayor frecuencia en ganglios, médula ósea, bazo, hígado y piel.

#### A.1. Punción ganglionar

Recomendada por su sencillez, buenos resultados y bajo riesgo (Giraud y Cabassu, 1936; Rioux y col., 1968b; Lanotte, 1975), ha sido la técnica más utilizada en el presente estudio.

La punción se ha realizado en el ganglio poplíteo, situado en la cara posterior de la rodilla.

Técnica: el animal se coloca en decúbito lateral. Se rasura y desinfecta la zona, con alcohol de 70° y se anestesia con clorhidrato de lidocaína (Cidancaína R, Lab. CIDAN, SA). Se deja actuar el anestésico durante unos minutos y se procede a la localización del ganglio comprimiéndolo entre los dedos. Se introduce, perforando la piel y después buscando el ganglio, una jeringa (ICO estéril) de 5 ml con 1 ml de solución salina y 1000 UI de penicilina, con aguja de 1.1x40 mm. Se realizan varios movimientos rotatorios con la aguja y se procede a la aspiración del líquido ganglionar.

El aspirado ganglionar es rápidamente inoculado en 4-5 tubos de medio de cultivo NNN (Novy, Mcneal, Nicolle) para el aislamiento del parásito. El resto del material obtenido se extiende en portaobjetos completamente desengrasados para proceder a su tinción con colorante de Giemsa.

#### A.2. Punción de médula ósea

La punción esternal de médula ósea (Carda Aparici, 1949; Covalada y col., 1951; Groulade y Bourdeau, 1988) ha sido también practicada. Es una técnica sencilla, pero comporta mayor peligrosidad.

Técnica: el animal se coloca en posición lateral y se rasura y desinfecta la zona a puncionar. Con dos dedos se localiza la unión cartílago-costal (epífisis costal) de la costilla (entre la 5ª y la 6ª) y con una jeringa de 5ml (ICO estéril), con 1 ml de solución salina y 1000 UI de penicilina, y aguja de 0.9x25 mm, se penetra directamente en la médula ósea y se realiza el aspirado.

El material obtenido se siembra en 4-5 tubos de medio de cultivo NNN y se realizan, con el resto, varios frotis en portaobjetos.

#### A.3. Biopsia cutánea

Poco utilizada para el diagnóstico, ya que es una técnica agresiva y de resultados mediocres, la biopsia cutánea es, sin embargo, importante para la identificación de cepas de *Leishmania* con carácter dermatrópico.

Las biopsias se han realizado de las úlceras o formaciones pre-ulcerosas que suelen localizarse en las articulaciones

de las patas, en el hocico y en las orejas. Los mejores resultados se obtienen al biopsiar los márgenes de la úlcera (Carda Aparici, 1949; O.M.S., 1984), donde se encuentran la mayoría de las formas parásitas.

Técnica: se limpia cuidadosamente la zona a biopsiar, levantando la costra si ésta se ha formado. Utilizando siempre material estéril, se realiza la biopsia con ayuda de un sacabocados de 4 mm de diámetro y, con pinzas y tijeras, se extrae y corta la pequeña porción biopsiada. Colocada en un homogeneizador, con un poco de solución salina estéril y penicilina (1 ml de solución salina con 5.000 UI de penicilina), se tritura y se siembra en varios tubos de medio de cultivo.

#### A.4. Otras técnicas

La punción de bazo y de hígado son técnicas, principalmente la primera, de buenos resultados pero peligrosas por el riesgo de hemorragias que comportan (Groulade y Bourdeau, 1988). Las técnicas de hemocultivo no son satisfactorias (Lanotte, 1975, Groulade y Bourdaeu, 1988).

#### B. Examen directo de la muestra

La visualización del agente causal proporciona el diagnóstico de certeza frente a una parasitosis. Para lograr la observación directa del parásito, el material retenido en la aguja inyectable se ha extendido en porta-objetos limpios y desengrasados, procediendo a su tinción posterior por el colorante de Giemsa. Los frotis se han dejado secar perfectamente y fijado con metanol 5 min., antes de proceder a su tinción.

### Tinción Giemsa

La solución colorante se prepara añadiendo dos gotas de solución Giemsa (Merck) por ml de agua destilada, y el mismo número de gotas de agua corriente.

Los frotis se cubren durante 30 min. con la solución colorante. Después, se escurre el exceso de colorante, se lavan con agua corriente y se dejan secar al aire.

La observación se realiza al microscopio a 1000 aumentos.

### C. Cultivo de la muestra

El cultivo de la muestra se ha realizado para confirmar el diagnóstico serológico y para lograr aislar y posteriormente identificar el agente etiológico.

Se ha utilizado el medio NNN (Novy, McNeal y Nicolle), que es el medio habitualmente usado en nuestro Laboratorio para el aislamiento de cepas de *Leishmania*. Sin embargo, en ocasiones, se ha recurrido a medios más enriquecidos.

La muestra se inocula en el medio difásico, 4-5 tubos, de modo que el material realmente inoculado esté muy diluido, lo que favorece el crecimiento de la forma promastigota del protozoo. Es de primordial importancia cuando la muestra a inocular es muy sanguinolenta (Evans, 1987a).

Los tubos inoculados se colocan en la estufa a 24<sup>0</sup>C. A los 7 días se realiza el primer examen microscópico, entre porta y cubre, de una gota de la fase líquida donde crece el protozoo. Cuando el examen es negativo, se reinoculan en nuevos tubos, de modo que hasta la cuarta resiembra no se considera un cultivo como negativo.

C.1. Medio NNN (Novy, MacNeal y Nicolle)

Es un medio agar-sangre difásico, no definido, compuesto de una fase sólida y de una fase líquida formada por su propio exudado.

Composición:

- Bacto-agar (Difco)..... 10 g
- Cloruro sódico ..... 6 g
- Agua destilada ..... 1000 ml
- Sangre de conejo ..... 10-12%

Preparación del medio:

- Agar: Se calienta el agua destilada a unos 80°C y se añade el cloruro sódico. En forma de lluvia, se agrega el bacto-agar y se lleva a ebullición durante unos minutos, con la precaución de agitar constantemente para evitar la formación de grumos. El agar se distribuye en tubos (9ml) o bien en frascos de Roux (100 ml) y erlenmeyers (25-30ml), que son utilizados para realizar cultivos en masa de los promastigotes. Después, los recipientes conteniendo el agar se esterilizan en el autoclave a 121°C durante 20 min. y se guardan en nevera.
- Sangre de conejo: Se obtiene por punción cardíaca. Se limpia la piel con alcohol de 70° y se introduce una aguja de 1.1x40 mm., unida a una jeringa de poliestireno estéril (ICO) de 50 ml, de modo que vaya directamente al corazón. La sangre se coloca en un erlenmeyer estéril con 3 ml de citrato sódico estéril al 10% y 250.000 UI de penicilina sódica, y se conserva en nevera a 4°C (máximo 15 días).

- Mezcla del agar con la sangre. Se añade un 10-12% de sangre a temperatura ambiente sobre la gelosa líquida, a unos 45°C, y se procede a la agitación lenta en movimiento rotatorio para evitar la formación de burbujas y conseguir una buena homogeneización. A continuación, se deja reposar durante varias horas a temperatura ambiente, para obtener la solidificación del agar-sangre y, posteriormente, se colocan los recipientes con el medio de cultivo en la nevera, donde pueden almacenarse durante un tiempo máximo de tres semanas.

## C.2. Otros medios de cultivo

### - Medio sólido corazón-cerebro

Es un medio agar-sangre enriquecido, difásico y no definido, adecuado para favorecer el crecimiento de cepas difíciles de cultivar o para mejorar el rendimiento de los cultivos (Dedet y Lanotte, 1969; Lanotte, 1975).

#### Composición:

- Bacto-Brain-Heart (Difco) ..... 52 g
- H<sub>2</sub>O destilada ..... 1000 ml
- Sangre de conejo ..... 10-12%

Preparación del medio: semejante al método utilizado para preparar el medio NNN (C.1., pag. 62). La ausencia de líquido de exudación hace necesario agregar solución salina estéril 0.9%, para conseguir la fase líquida.

- Medio líquido corazón-cerebro

Es un medio líquido utilizado para suplementar cultivos difíciles o cultivos de escaso crecimiento en un medio habitual como el NNN.

Composición:

- Bacto-Brain-Heart (Difco) ..... 1 g
- H<sub>2</sub>O destilada ..... 1000 ml

Preparación del medio: El agua destilada se calienta a 80°C y se añade el agar, llevándose a ebullición durante algunos minutos. El medio se alicuota y se autoclava a 121°C durante 20 min., para guardarse estéril en nevera.

D. Congelación de las cepas aisladas

Las cepas de *Leishmania* se conservan congeladas en nitrógeno líquido, bajo la forma promastigota, en pequeños viales de polipropileno estériles (Costar). Como agente protector se ha utilizado glicerol a la concentración final del 10% (Allain, 1964).

Los promastigotes, obtenidos en medio de cultivo NNN después de 7 días de incubación, son recogidos de la fase líquida para proceder a su recuento en cámara de Neubauer. De cada cepa se congelan 5 viales, que contienen 1ml de medio de cultivo ( $10^5$  promastigotes/ml) con un 10% de glicerol.

Es importante conseguir un descenso gradual de la temperatura para mantener la viabilidad de los promastigotes. Los viales se congelan a -20°C y después de una hora se colocan en el depósito del nitrógeno líquido (contenedor CDB 10, AOL), con la precaución de situarlos en la fase del vapor durante varias

horas, antes de sumergirlos en la fase líquida a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Chang y Hendricks, 1985).

#### IV.1.2.3. Diagnóstico inmunológico.

Se ha basado en la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* para identificar los animales que han tenido contacto con el parásito.

##### IV.1.2.3.1. Muestras: sangre total y/o suero

###### A. Toma de muestra

La sangre se ha extraído de la vena cefálica de la pata delantera, con una aguja de 1.1x40 mm, después de ligera presión en su parte superior. Se ha recogido en tubos de plástico de 5 ml, correctamente identificados. Una alícuota se ha embebido en papeles de filtro (Whatman n°3), igualmente codificados.

###### B. Conservación de las muestras

La conservación y tratamiento previo de las muestras ha dependido del sistema utilizado:

- Papel Whatman n°3: La sangre se deja secar completamente y se almacena en congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la que se considera que puede conservarse durante largo tiempo (O.M.S., 1977; Jahn y Diesfeld, 1983; Ho y col., 1984; Seguí y col., 1990; Kagan, 1972; Guimaraes y col., 1985). A temperatura ambiente, la

muestra mantiene su título serológico durante aproximadamente 40 días, observándose modificaciones transcurrido ese período de tiempo en función de la temperatura (Seguí y col., 1990).

- Sueros: La sangre recogida en tubo se deja coagular a temperatura ambiente (O.M.S., 1977) y se centrifuga 20 min. a 2.500 rpm. Se separa el suero y se almacena congelado, en diversas alícuotas, sin adicionar conservantes, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### C. Preparación de las muestras

Las muestras se eluyen en el tampón de trabajo a la concentración máxima a ensayar según la técnica.

Aplicando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), se toma 1/10 en tampón fosfato (PBS) (Lanotte, 1975) como la dilución mínima a ensayar y utilizando la técnica "Dot-Enzymo-Immuno-Assay" ("Dot-ELISA"), se toma 1/100 en tampón Tris-salino-tween-leche descremada al 1% (TST-leche 1%) (Anexo 3), ya se parta de suero o de sangre total (Fisa y col, 1987). La elución de la sangre embebida en el papel de filtro se realiza mediante agitación constante durante una hora (Seguí y col, 1990), prolongándose hasta 2 horas cuando se trata de muestras largamente conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , calculando la dilución 1/100 como la correspondiente a un disco de papel de 6 mm de diámetro, eluido en 250  $\mu\text{l}$  de tampón.

- Cálculo de la dilución 1/100 con sangre total absorbida en papel Whatman n°3

Se halla la capacidad de absorción del papel de filtro aplicando distintas gotas de sangre, de 1  $\mu\text{l}$  a 10  $\mu\text{l}$ , con

pipeta Hamilton, y observando el diámetro de halo formado.

Se calcula que a un halo de 6 mm de diámetro le corresponden 5  $\mu$ l de sangre, que es el diámetro estándar que realizan los sacabocados del mercado.

Conociendo el hematocrito del perro, que es aproximadamente del 50% ( $45 \pm 7$ ), podemos deducir que al eluir un disco estándar, que posee 5  $\mu$ l de sangre o sea aproximadamente 2.5  $\mu$ l de plasma, en 250  $\mu$ l de tampón se consigue fácilmente la dilución mínima de trabajo 1/100.

- Comparación en paralelo entre los resultados serológicos obtenidos de suero y de sangre total recogida sobre papel de filtro.

Sobre 59 muestras recogidas mediante los dos sistemas, suero y sangre total sobre papel de filtro, se ha realizado un estudio paralelo mediante la técnica "Dot-ELISA"-Proteína A-PO (IV.1.2.3.2.A.2., pag. 72 ), partiendo en ambos casos de la dilución mínima 1/100. Las muestras estudiadas fueron seleccionadas previamente, de modo que fuesen representativas de los distintos títulos serológicos. (Anexo 2).

Los resultados obtenidos se expresan en la Fig. 9, observándose que las variaciones han sido de tan solo una dilución, oscilaciones que no se consideran significativas (variación significativa en un test serológico: mínimo dos titulaciones). Estadísticamente se ha hallado una buena correlación, como indica el coeficiente de concordancia de Kendall  $\tau = 0.906$ ,  $\alpha < 0.05$  (Anexo 6).

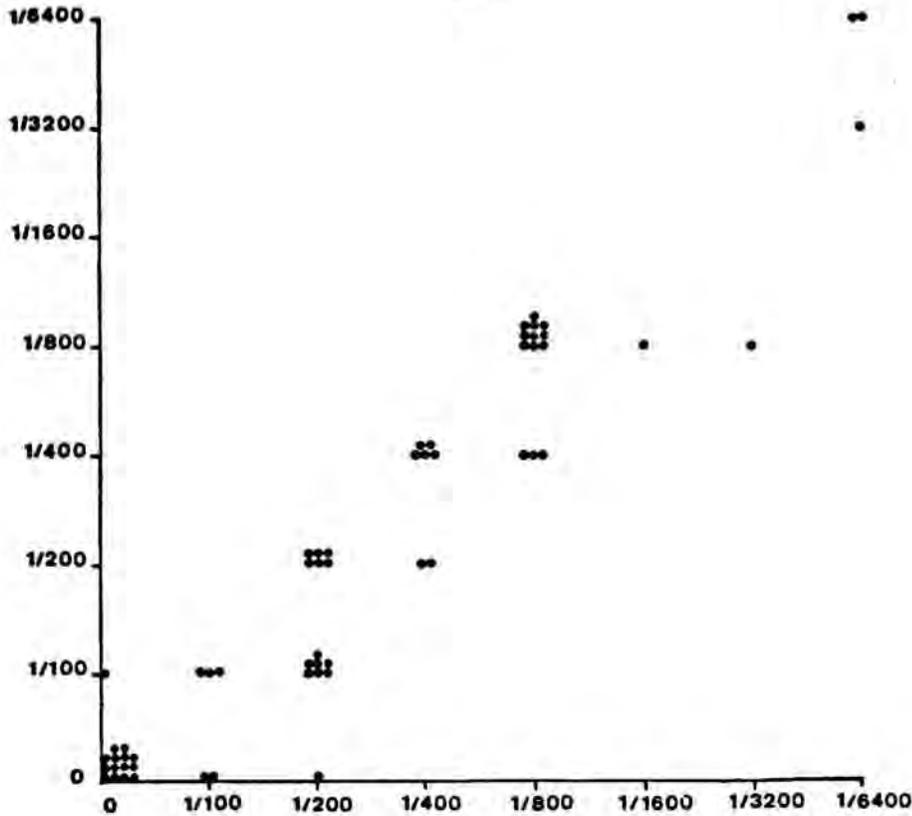


Fig. 9. Comparación suero/sangre total mediante la técnica "Dot-ELISA".

#### IV.1.2.3.2. Técnicas serológicas utilizadas

Son técnicas basadas en la detección de anticuerpos circulantes anti-*Leishmania*, utilizando como antígeno promastigotes enteros de *Leishmania*.

#### A. Descripción de las técnicas

##### A.1. Técnica IFI

Se ha utilizado el método de inmunofluorescencia indirecta, basado en poner de manifiesto el complejo antígeno-anticuerpo mediante una anti-inmunoglobulina marcada con fluorocromo, siguiendo la pauta descrita por Quilici y col. (1968).

**-Material y reactivos utilizados**

- Portaobjetos, de 18 pocillos de 4mm de diámetro.
- Antígeno, suspensión de promastigotes enteros de *Leishmania* a la concentración de  $2 \cdot 10^6$  promastigotes/ml en PBS pH=7.2 formolados al 2%, obtenidos mediante cultivo en NNN de una cepa autóctona de *Leishmania infantum* (MCAN/ES/84/BCN-3 MON-1).
- Fijador, acetona anhidra durante 10 min. a temperatura ambiente.
- Tampón de trabajo, tampón fosfato a pH=7.2 (PBS) (Anexo 5).
- Sueros problema, diluciones seriadas en PBS (1/10, 1/20, 1/40, 1/80....1/1280). No se realiza la descomplementación de éstos, ya que no aporta ninguna modificación (Quilici y col., 1968).
- Conjugado fluorescente, anti-Inmunoglobulinas (anti-IgG (H+L) de perro marcadas con isotiocianato de fluoresceína (SEROTEC) a la dilución 1/100.
- Colorante de contraste, azul de Evans a la dilución 1/10.000, preparado extemporáneamente a partir de una solución madre al 1/100 en PBS pH=7.2, que se puede conservar en nevera en frascos color topacio. Su empleo es recomendable para atenuar la fluorescencia inespecífica, ya que produce un contraste más claro entre los casos positivos y los negativos, además de no modificar la sensibilidad de la reacción (Lanotte, 1975).

- Líquido de montaje, glicerina tamponada (9 partes de glicerina pura (Merck), 1 parte de tampón PBS pH=7.2), que se conserva a temperatura ambiente durante el tiempo aproximado de un mes.
- Microscopio de fluorescencia, Leitz Dialux 20 EB de luz transmitida, con lámpara de mercurio de superpresión, filtro de excitación selectivo de vidrio azul y filtro de absorción amarillo. El condensador es de fondo claro y a seco.

#### -Cálculo de la dilución de conjugado

Se ha utilizado un conjugado anti-IgG fluorescente comercial (SEROTEC) a la dilución de 1/100 en tampón PBS pH=7.2, valorado con sueros de titulación conocida proporcionados por el Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier.

La dilución óptima se calcula por el sistema de diluciones crecientes de suero y de conjugado, observando la dilución que permite tener la diferencia máxima entre los sueros positivos y negativos, mientras el control de conjugado (antígeno incubado con el conjugado y el substrato) sea totalmente negativo (O.M.S., 1977).

#### -Marcha de la reacción

- a) Los portaobjetos con el antígeno fijado se descongelan a temperatura ambiente durante 10 min. y se fijan con acetona anhidra durante 10 min., también a temperatura ambiente.
- b) Se dejan secar al aire y se numeran.

- c) Se colocan las diluciones adecuadas de suero en cada círculo (10µl) y se incuban en cámara húmeda 30 min. a 37°C.
- d) Se lavan tres veces con PBS, durante 5 min. cada vez, y se dejan secar.
- e) La incubación con el conjugado y la contracoloración se realiza al mismo tiempo. Para ello, se cubre cada círculo con 10µl de conjugado fluorescente a la dilución 1/100 en azul de Evans al 1/10.000, y posteriormente se incuba en cámara húmeda 30 min. a 37°C.
- f) Se realiza el lavado de los porta-objetos tal y como se indica en el apartado d) y se dejan secar.
- g) Una vez secos, se procede a su montaje colocando unas gotas de glicerina tamponada y cubriéndolos con un cubre-objetos de 26x60 mm.
- h) La lectura se realiza con el microscopio de fluorescencia, descrito anteriormente, con objetivo 40x.

#### -Controles

En cada examen se incluyen diversos controles:

- a) Suero positivo de perro de título conocido a distintas diluciones.
- b) Suero negativo de perro a diversas diluciones.
- c) Control de conjugado, para verificar que no existe fluorescencia inespecífica debida al conjugado.

### **-Criterio de positividad**

La reacción se ha considerado positiva al observar una clara fluorescencia verde brillante y negativa al observar una coloración rojiza. Cuando la reacción es muy positiva tanto la membrana y el flagelo como el citoplasma de los promastigotes aparecen fluorescentes. Sin embargo, al disminuir la positividad se mantiene la fluorescencia en la membrana y el flagelo, para desaparecer del citoplasma que pasa a ser de color rojo.

Consideramos como límite de positividad una coloración irregular en la que la fluorescencia de la membrana empieza a desaparecer.

### **A.2. Técnica "Dot-ELISA"**

Se ha utilizado la técnica "Dot-ELISA" descrita y estandarizada por Pappas (Pappas y col., 1983a; Pappas y col., 1983b; Pappas y col., 1984b; Pappas y col., 1985b; Pappas y col., 1985c; Pappas, 1986) para el diagnóstico de la leishmaniosis visceral en el Viejo Mundo. Es una técnica inmunoenzimática, de lectura visual, que precisa pequeños volúmenes de antígeno fijados sobre nitrocelulosa y un substrato cromogénico precipitable. Es una técnica fácilmente adaptable a estudios sobre el terreno, que presenta como ventajas importantes su rapidez (aproximadamente 2h.), transportabilidad, conservación de los reactivos a temperatura ambiente, requerir muy pequeñas cantidades de antígeno, lectura visual y una sensibilidad y especificidad equivalente a las técnicas ELISA estándar (Pappas y col., 1984a). Por ello ha sido aplicado por diversos autores al estudio de la leishmaniosis (Gustafson y col., 1985; Fisa y col., 1987; Srivastava y Singh, 1988; Scott y col., 1991) y al estudio de otras enfermedades (Pappas y col., 1985a; Boctor y col., 1987;

Téllez Girón y col., 1987; Pappas, 1988; Chan y Ko, 1988; Paz y Guevara, 1990; Zheng Hui-Jun y col., 1990).

**-Descripción de la técnica**

- Soporte: Membranas de nitrocelulosa (Millipore). Permite la unión de sustancias muy distintas como proteínas, ácidos nucleicos, organelas subcelulares, hongos, protozoos, bacterias y virus (Hawkes y col., 1982).

En un principio se trabajó sobre discos de nitrocelulosa de 6mm de diámetro, que se colocaban en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Greiner), con ayuda de pinzas para evitar cualquier contaminación. Después, con un aparato Bio-Dot (Bio-Rad), se han utilizado membranas de nitrocelulosa de 9x12 cm, lo que ha simplificado la manipulación al evitar tener que realizar y colocar los discos en la placa de microtitulación, y simplificar el vaciado de los reactivos y los lavados.

- Antígeno: Suspensión de promastigotes formolados al 1.5% en PBS pH=7.2, a la concentración de  $2.10^5$  promastigotes/ $\mu$ l, obtenidos de una cepa autóctona de *Leishmania infantum* (MCAN/ES/84/BCN-3 ZMON-1), como se indica en el apartado IV.1.2.3.2.B., pag.79.
- Adsorción del antígeno: La unión de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se basa en uniones no-covalentes poco conocidas (Wallis y col., 1979; Preswood, 1981). Se ha de tener en cuenta que la capacidad de adsorción de la membrana va disminuyendo a lo largo tiempo.

La adsorción se realiza colocando 1  $\mu$ l de antígeno con jeringa Hamilton de 50  $\mu$ l, con dispositivo de repetición, y dejándolo secar durante una hora a 37°C.

- Bloqueo: Para evitar la unión inespecífica de proteínas a la membrana de nitrocelulosa, lo que induciría a falsas reacciones positivas o a una coloración de fondo importante, es imprescindible bloquear la membrana con una proteína inerte u otros agentes bloqueantes, de modo que ocupen los sitios no ocupados por el antígeno.

Como solución bloqueante se emplea Tris-salino-leche descremada al 5% (TST-leche 5%, Anexo 5) durante 30 min., en agitación, a temperatura ambiente.

La membrana puede guardarse congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  una vez se ha realizado el bloqueo.

- Adición de la muestra. Se adiciona el suero a analizar, a las diluciones adecuadas, en el tampón Tris-salino-Tween-leche descremada 1% (TST-leche 1%, Anexo 5) a fin de evitar la fijación inespecífica a la fase sólida.

Se realizan diluciones crecientes, a partir de 1/100 hasta 1/6400, para conocer el título final.

- Conjugado: Se emplea Proteína A marcada con peroxidasa a la dilución adecuada. La Proteína A, aislada de la pared celular del *Staphylococcus aureus* (generalmente de la cepa Cowan I), tiene afinidad por el fragmento Fc de muchas IgG de diversos animales, que se indican en la Tabla 6. La reactividad frente a las Ig depende de la especie, de la clase y subclase de inmunoglobulina y de las condiciones iónicas.

Según Goding (1978) la Proteína A posee como mínimo dos puntos de unión accesibles a la porción Fc de las inmunoglobulinas. Conjugada con un enzima como la peroxidasa (Horseradish peroxidasa HRP) (Van y Weermen, 1971) puede ser utilizada frente a diversas especies, con

una afinidad que es muchas veces superior a la de las propias anti-Inmunoglobulinas. Además, el utilizar el enzima unido a la proteína A produce generalmente menos coloración de fondo que al unirse a una anti-Inmunoglobulina. Sin embargo, es desactivada por el preservativo azida sódica, muy utilizado en los laboratorios (Pappas, 1988).

Especies	Unión		
	Fuerte	Débil	No reac.
Hombre <sup>b</sup>	<i>IgG1,2,4</i>		IgG3
Mono	IgG, 3 sub-clases		
Conejo	IgG		
Vaca	IgG1		IgG2
Cerdo <sup>b</sup>	IgG		
Oveja	IgG2		IgG1
Cabra	IgG2	IgG1	
Perro <sup>b</sup>	IgG		
Rata <sup>b</sup>	IgG1,2c	IgG2b	IgG2a
Ratón	IgG2a,2b	<i>IgG1</i>	
Hamster	IgG1	<i>IgG2</i>	
Cobayo	IgG1,2		
Pájaros			IgY

Tabla 6. Reactividad de la Proteína A frente a las inmunoglobulinas de diferentes especies animales (Basado en Tjseen, 1986)

- <sup>a</sup> Las subclases en itálica representan las IgG mayoritarias.
- <sup>b</sup> Otras clases de inmunoglobulinas pueden unirse también.
- <sup>c</sup> Unión fuerte: IgG que eluye en una columna de Sepharosa-Proteína A a pH < 6.0. Unión débil: IgG que eluye a pH > 6.0.

- Cálculo de la dilución de conjugado: La dilución óptima debe calcularse para cada nuevo lote de conjugado. Se determina mediante un sistema de diluciones crecientes en damero de suero y de conjugado (utilizando un suero control positivo y un suero control negativo), para obtener la máxima diferencia entre los sueros positivos y negativos (O.M.S., 1977).

Se ha utilizado la Proteína A- PO (Sigma) a la dilución 1/1000- 1/2000, según el lote, en tampón TST-leche 1%, incubándose a 37°C durante 30 min.

- Substrato: Se ha usado el substrato cromogénico precipitable (4C1N) 4cloro-1-naftol, (Merck) (Anexo 5).
- Lectura: Se observa la aparición de pequeñas manchas azul intenso, bien definidas, que corresponden a las gotas de antígeno depositadas. La lectura se realiza observando la máxima dilución donde aún aparece color.

#### -Marcha de la reacción

La membrana de nitrocelulosa, 9x12 cm, se humedece en el tampón de trabajo Tris-salino (TS, Anexo 5) y se deja secar una hora a 37°C. Se coloca en el aparato Bio-Dot y se sensibiliza con el antígeno colocando 1µl en cada pocillo. A continuación se deja secar durante una hora a 37°C, para conseguir la adsorción a la placa, y se procede al bloqueo de la membrana con TS-leche 5% durante 30 min. en agitación. Tras lavar la placa con TS, ésta puede guardarse en congelador a -30°C o bien utilizarse continuando la reacción enzimática.

Los sueros se incuban a las diferentes diluciones durante 30 min., a 37°C, a razón de 50 µl por pocillo en agitación constante.

Después de descartar las soluciones y lavar 3 veces con TST durante 5 min. cada vez, se adiciona el conjugado Proteína A-PO a la dilución adecuada, 50 µl/pocillo, dejándolo incubar durante 20 min. a 37°C, en agitación lenta.

Se retira la membrana del aparato Bio-Dot y tras lavar la placa con los tampones (2 veces con TST, 1 vez con TS y un último lavado rápido con TS 500mM), se adiciona el substrato cromogénico o dador de protones, a razón de 10 ml, al que se ha añadido 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después, se deja incubar a temperatura ambiente durante unos minutos hasta que los controles positivos alcancen los valores conocidos y sin que aparezca color en el control negativo. La reacción enzimática se detiene añadiendo agua corriente, y se procede a la lectura visual después de secar bien la placa.

Controles, en cada una de las placas se incluye:

- a) Controles positivos: se utilizan dos sueros positivos. Un primer control positivo alto, con título 1/6400, y un segundo control positivo bajo, con título 1/800.
- b) Control negativo: se utiliza un suero negativo, previamente valorado por IFI y "Dot-ELISA", que corresponde a un perro joven de varios meses, con posibilidades nulas de contacto con el parásito.
- c) Control de conjugado: se realiza sin adición de suero para observar que no existe reacción inespecífica entre antígeno y substrato.
- d) Control de suero: se realiza obviando la adición de conjugado para descartar que el suero o la sangre total posean actividad peroxidásica por sí mismos.

-Criterio de positividad

La reacción se ha considerado positiva al observar la aparición de color azul intenso.

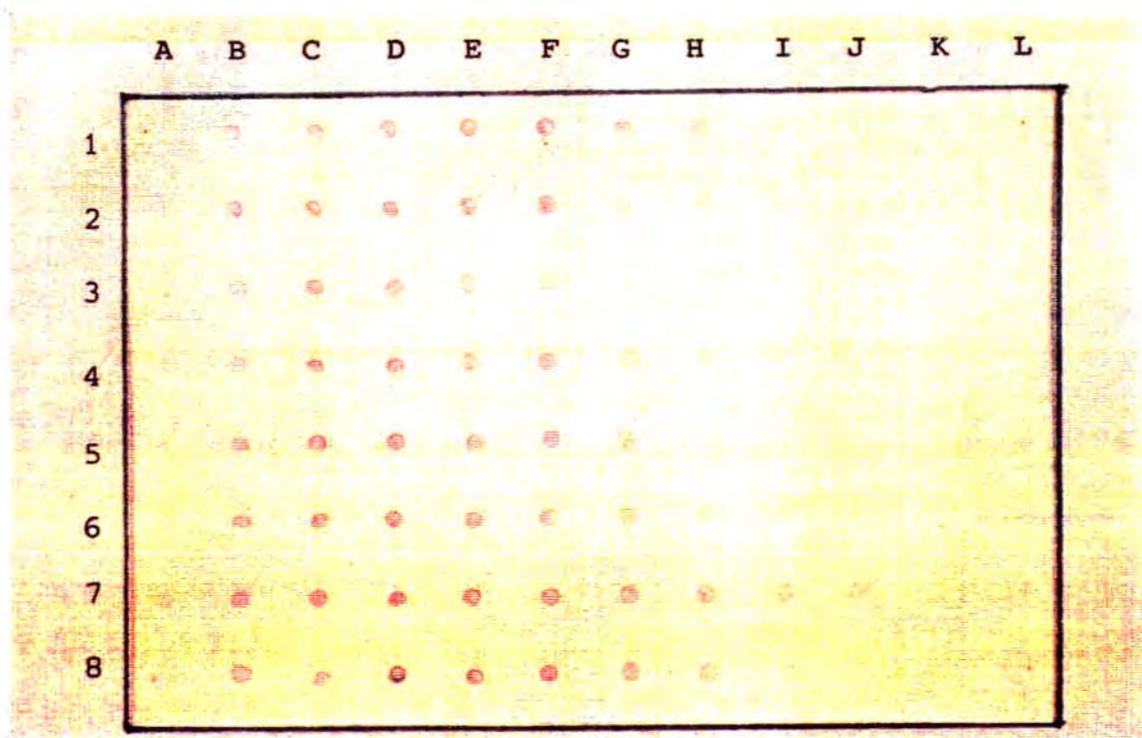


Fig. 10. Placa revelada de "Dot-ELISA"



Fig. 11. Aparato Bio-DOT utilizado.

## B. Preparación del antígeno

Se ha utilizado como antígeno promastigotes enteros formolados de una cepa de *Leishmania infantum* autóctona, MCAN/ES/84/BCN-3 ZMON-1, aislada por nuestro Laboratorio (9.4.1984) en un perro (ganglio poplíteo), e identificada en el Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier. La cepa se aisló en medio NNN y se ha mantenido congelada en nitrógeno líquido.

Para preparar el antígeno es imprescindible conseguir un crecimiento importante de promastigotes. Para ello se realizan cultivos en masa, en frascos de Roux de 1000 ml, en medio NNN. Al séptimo día la fase líquida se recoge y centrifuga a pocas revoluciones, 500 r.p.m. durante 10 min., para eliminar los residuos de gelosa que puedan existir. El sobrenadante se recupera y centrifuga, a 2.500 r.p.m. durante 5 min., para lograr la sedimentación de los promastigotes. Se realizan a continuación tres lavados del sedimento: el primero con solución salina al 0.3%, para lisar los hematíes presentes, y los siguientes con solución salina al 0.9%, centrifugando a 2.500 r.p.m. durante 10 min.

Los promastigotes se resuspenden en el tampón de trabajo y se procede al recuento en cámara Neubauer bajo el microscopio a 400 aumentos, para conseguir la concentración adecuada. Para la técnica de IFI la suspensión se ha preparado a la concentración de  $2 \cdot 10^6$  promastigotes/ml (Lanotte, 1975) en tampón PBS formolado al 2%, y para la técnica inmunoenzimática "Dot-ELISA" a la concentración de  $2 \cdot 10^5$  promastigotes/ $\mu$ l en tris-salino formolado al 1.5%.

### IV.1.3. IDENTIFICACION DEL PARASITO

#### IV.1.3.1. Criterio de identificación y clasificación utilizado

La identificación de las distintas cepas aisladas se ha realizado por la caracterización de sus perfiles enzimáticos. Los enzimas regulan las reacciones del metabolismo celular, admitiéndose para una misma función ligeras alteraciones estructurales en la molécula del enzima (Isoenzimas). Estas diferencias que no son de carácter adaptativo y estan representadas en la secuencia de ADN, sirven de base al presente método taxonómico.

El análisis electroforético se ha llevado a cabo en el Laboratoire d'Ecologie Medicale et Pathologie de Montpellier, sobre 13 sistemas enzimáticos (Tabla 7), en geles de almidón (Moreno, 1989), siguiendo la técnica descrita por Lanotte y Maazoun (Lanotte y col., 1981; Maazoun y col., 1981a).

PROTEINA	CODIGO IDENTIF.
MDH - Malato deshidrogenasa	EC 1.1.1.37
ME - Enzima málico	EC 1.1.1.40
ICD - Isocitrato deshidrogenasa	EC 1.1.1.42
PGD - Fosfogluconato deshidrogenasa	EC 1.1.1.44
G6PD- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	EC 1.1.1.49
GLUD- Glutamato deshidrogenasa	EC 1.4.1.3
DIA - DADH diaforasa	EC 1.6.2.2
NP - Purina nucleosido fosforilasa	EC 2.4.2.1
GOT - Glutamato-oxalacetato transaminasa	EC 2.6.1.1
PGM - Fosfoglucomutasa	EC 2.7.5.1
FH - Fumarato hidratasa	EC 4.2.1.2
MPI - Manosa fosfato isomerasa	EC 5.3.1.8
GPI - Glucosa fosfato isomerasa	EC 5.3.1.9

Tabla 7. Sistemas enzimáticos estudiados.

El conjunto de cepas que presentan un mismo perfil enzimático constituye un zimodema, representado por una cepa de referencia.

Para el análisis se utilizan los extractos proteicos de las cepas, preparados a partir de cultivos en masa y conservados en nitrógeno líquido en forma de perlas de 50µl (Moreno, 1984). Se realizan las electroforesis de los 13 enzimas, en cubetas de migración y, después del revelado, se procede a la identificación de los electromorfos sobre los geles o bien sobre fotografías tomadas inmediatamente después del revelado enzimático.

La velocidad de migración de cada electromorfo se calcula en mm, comparándose con la de un marcador de referencia (cepa MHOM/FR/78/LEM-75, aislada de una leishmaniosis visceral infantil en las Cevennes, Francia) introducido en el mismo gel, aplicando la fórmula:

$$I_{mx} = dx/d_{75} \times 100$$

siendo:  $I_{mx}$  - Índice de movilidad relativa de una banda x.

$dx$  - Distancia recorrida por la banda de la cepa x a partir de su punto de partida.

$d_{75}$  - Distancia recorrida por la banda de la cepa referencia en las mismas condiciones.

Cada electromorfo se nombra por las siglas del sistema enzimático correspondiente seguida de su  $I_m$  (ej. GOT<sup>100</sup>).

Por convenio, las distancias de migración de las bandas de la cepa referencia LEM-75 reciben el valor 100%, considerando que los allozymas de base 100 son los más comunes en el locus

estudiado. Ello permite distribuir los valores como superiores o inferiores a 100, que es el valor de referencia, y medir migraciones intermedias entre dos valores conocidos (cepas marcadoras).

#### IV.1.3.2. Nomenclatura

Siguiendo la nomenclatura recomendada por la O.M.S. (O.M.S., 1984) para la caracterización bioquímica de las cepas de *Leishmania*, el código utilizado para describir los aislamientos debe hacer referencia a:

1. Hospedador del que se aísla la cepa. Se utiliza un código de 4 letras. La primera se refiere a la clase a la que pertenece el hospedador (M para mamíferos e I para insectos), y las otras 3 indican el género.

Ej. MHOM- hombre

2. País donde se ha efectuado el aislamiento. Se utiliza el código "ISO".

Ej. ES - España

3. Año del aislamiento, indicado por sus dos últimas cifras.

4. Código del laboratorio donde se ha aislado la cepa, utilizando las siglas correspondientes. En nuestro caso BCN.

Estos cuatro datos deben separarse por barras oblicuas. Ej. MCAN/ES/84/BCN-3.

#### IV.1.3.3. Cepas estudiadas

El perfil enzimático se ha determinado en 27 cepas correspondientes a 23 perros, previamente diagnosticados serológicamente, con o sin sintomatología. El análisis isoenzimático se ha realizado en el Laboratoire d'Ecologie Medicale et Pathologie Parasitaire de la Facultad de Medicina de Montpellier.

En la Tabla 8 se indican las cepas aisladas y tipificadas sobre los animales estudiados, los órganos de los que se ha aislado el parásito (ganglio poplíteo, médula ósea, lesión cutánea) y la procedencia de los animales por poblaciones.

n°/N°	Organo de aislamiento		Localidad (N°)
	G	L	
1/1	1	0	Bellmunt (1)
2/2	2	0	El Molar (6)
2/2	2	0	Falset (8)
1/1	1	0	Marçà (15)
8/7	8	0	Poboleda (18)
1/1	1	0	Porrera (19)
1/1	1	0	Scala Dei (21)
11/8	9	2	Torroja (22)
27/23	25	2	

Tabla 8 Cepas de *Leishmania*, de procedencia canina, aisladas y tipificadas en la comarca del Priorato.

n°: número de cepas aisladas, N°: número de animales

G: ganglio poplíteo, M.O: médula ósea, L: lesión cutánea

(N°): número de identificación de la población

**RESULTADOS**

## IV.2. RESULTADOS

### IV.2.1. PRESENTACION DEL CONJUNTO DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA POBLACION ESTUDIADA

Los resultados serológicos y de los cultivos de toda la población canina estudiada se indican en la Tabla 9. El resultado serológico simultáneo a un cultivo ganglionar se indica en negrita. La sintomatología que presentó el animal se indica ordenadamente con relación a cada uno de los exámenes serológicos, basándose en los criterios de 0= asintómicos, += oligosintomáticos y ++= sintomático, expresados en el apartado IV.1.2.1., pag.57.

A pesar de que en la mayoría de los sueros estudiados mediante IFI se realizó "a posteriori" la técnica "Dot-ELISA", se mantienen los resultados obtenidos en la primera determinación serológica que se realizó en los mismos.

1 Bellmunt del Priorat

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
585	M	neg			0
586	H	1/100			0
587	H	neg			0
588	H	1/100			0
589	H	1/100			0
590	M	neg			0
591	H	neg			0
592	H	neg			0
593	H	neg			0
594	M	1/100			0
595	H	1/100			0
596	H	neg			0
597	M	neg			+
598	M	neg			0
599	M	neg			+
600	H	1/200			0
601	H	neg			0
602	H	neg			+
603	H	neg			++
604	M	1/6400		neg	++ (exitus)
605	H	neg			0
606	M	neg			0
607	H	1/200			0
608	H	1/400	1/1600	neg	++/++
609	M	1/100			0
					..../...

..../...

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
610	H	1/100			+
611	H	1/3200		pos	+ (exitus)
612	H	1/6400		pos	++ (exitus)
613	H	neg			0
614	H	neg			0
615	H	neg			0
616	M	neg			0
617	M	neg			0
618	M	neg			0
619	M	neg			0
620	M	neg			+
621	H	neg			+
622	M	neg			0
623	M	neg			0
624	H	1/100			0
625	M	neg	neg		0/0
626	H	1/100	1/400		0/0
627	H	1/100			0 (exitus)
628	M	1/400	1/400	neg	+/+
629	H	1/200			0 (exitus)
630	H	neg			0
631	H	1/100			0
632	H	neg			0
633	H	1/100			0
634	M	1/400	1/800	neg	+/+
635	H	1/100			0
636	M	1/6400			++ (exitus)
637	H	1/800			0

2. Cabassera

N°	Sexo	"Dot -E L I S A"			Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)	1990		
170	M	neg		neg		0/0
171	H	neg				0
172	H	neg		1/100		0/0
173	H	neg		neg		0/0
174	M	neg				0
175	H	neg		neg		0/0
176	M	1/100		1/200		0/0
177	H	neg		neg		0/0
178	H	neg		neg		0/0
179	H	neg		neg		0/0
180	M	neg				0
181	H	neg		neg		0/0
182	M	neg		neg		0/0
183	H	neg		neg		0/0
184	M	neg		1/200		0/0
185	M	neg				0 (exitus)
186	H	neg				0
187	M	neg		1/200		0/0
188	M	1/100		1/800		0/0
189	H	neg		neg		0/0
190	H	neg		1/100		0/+
191	M	neg		1/100		0/0
192	M	1/100		1/100		0/0
193	M	1/800	1/800		pos	++/++ (exitus)
194	M	1/200				0
195	M	neg				0 (exitus)
196	H	1/800		1/800		0/0
197	M	1/100		1/100		0/0

..../....

...../...

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"			Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)	1990		
198	H	1/100		1/100		0/0
199	H	1/100				+
200	M			1/400		0
201	M			neg		0
202	H			neg		0
203	M			1/100		0
204	H			neg		0
205	H			neg		0

### 3. Capçanes

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"			Cultivo	Sintomatología
		1988	1989(1)	1989(2)		
746	M	neg				0 (exitus)
747	M	neg	1/200	1/200		0/0/0
748	M	neg				0
749	M	1/100				0
750	H	1/6400	1/6400			+/** (exitus)
751	H	neg				0
752	M	1/200				+
753	M	1/100				0
754	M	neg				0

...../...

...../...

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"		Cultivo	Sintomatología
		1988	1989 <sup>(1)</sup> 1989 <sup>(2)</sup>		
755	M	1/100			+
756	H	1/200			0
757	H	neg			0
758	H	neg	1/200		0/+
759	M	neg			0
760	M	neg			0
761	M	neg			+
762	M	1/100			+
763	H	neg			0
764	H		1/100		0

4 Ciurana

N°	Sexo	"Dot-ELISA"	Cultivo	Sintomatología
		1989		
206	H	neg		0
207	M	neg		0
208	H	neg		0
209	H	neg		0
210	H	neg		0
211	H	neg		0
212	H	neg		+
213	M	neg		0
214	H	neg		0

5. Cornudella

N°	Sexo	IFI	"Dot - E L I S A"		Cultivo	Sintomatología
			1985	1989(1)		
472	M	neg				0
473	M	neg				0
474	H	neg	neg		neg	0/0/0
475	H	neg				0
476	M	neg	1/6400			0/++ (exitus)
477	M	neg				0
478	M	neg				0
479	M	neg	1/100			0/+
480	H	neg				0
481	M	neg	neg			0/0
482	H	neg				0
483	H	neg			neg	0/+
484	M	neg				0
485	H	neg				0
486	H	neg	neg		neg	0/0/0
487	H	neg				0
488	H	neg				0
489	H	neg				0
490	H	neg	1/100			0/0
491	H	neg				0
492	M	neg	neg		neg	0/0/+
493	H	neg	neg		neg	0/0/0
494	M	neg				0
495	H	neg			neg	0/0
496	H	neg				0
497	M	neg	1/100			0/+
498	H	neg				0
499	H	neg				0
500	H	neg				0

..../...

..../....

N°	Sexo	IFI 1985	"Dot - E L I S A"			Cultivo	Sintomatología
			1989(1)	1989(2)	1990		
501	M	neg	neg			0/0	
502	M	neg				0	
503	H	neg	neg		neg	0/0/0	
504	H	neg				0	
505	M	neg				0	
506	H	neg	neg			0/+ (exitus)	
507	H	neg				0	
508	M	neg			1/100	0/0	
509	H	neg				0	
510	M	neg			1/400	0/0	
511	M	neg				0	
512	M	neg			1/800	0/+	
513	M	neg				0	
514	M	1/20	1/6400	1/3200	neg/pos	0/+/+/+	
515	H	neg				0	
516	H	neg				0	
517	M	neg				0	
518	M	neg				0	
519	M	neg	neg			0/0	
520	H	neg				0	
521	H	neg				0	
522	H	neg				0	
523	H	neg			neg	0/0	
524	M	neg				0	
525	H	neg	1/100			0/0	
526	H	neg	neg			0/0	
527	H	neg				0	
528	H	1/40				0	
529	H	1/80				0	

..../....

...../.....

N°	Sexo	IFI	"Dot - E L I S A"			Cultivo	Sintomatología
			1985	1989(1)	1989(2)		
530	H	1/40					0
531	M	neg					0
532	H	neg					0
533	H	neg					0
534	H	neg	neg				0/0
535	H	neg					0
536	M	neg					0
537	M	neg					0
538	H	neg					0
539	H	neg	1/400	1/400	1/400	neg/neg	0/+/+/+/+
540	H	neg	1/400	1/400	1/400	neg/neg	0/0/+/0
541	H		neg		1/400		0/0
542	H		neg		neg		0/0
543	M		neg				0
544	M		neg		neg		0/0
545	M		neg				0
546	M		neg		neg		0/0
547	M		neg		neg		0/0
548	M		neg		neg		+/+
549	M		1/200				++
550	M		neg				0
551	M		neg				0
552	H		neg				0
553	M		1/100		1/200		0/0
554	H		1/100		1/200		0/0
555	H		neg		neg		0/0
556	M		1/200				0
557	M		1/800	1/1600	1/3200	pos	+/+/+
558	M		neg				0

...../.....

..../...

N°	Sexo	IFI	"Dot - E L I S A"			Cultivo	Sintomatología
			1985	1989(1)	1989(2)		
559	M		1/100		1/100	0/0	
560	H		1/200			0	
561	M		neg		neg	0/0	
562	M		neg			0	
563	M				neg	0	
564	H				neg	0	
565	M				neg	0	
566	H				neg	0	
567	H				1/6400	0	
568	M				1/200	0	
569	H				neg	+	
570	H				neg	0	
571	H				neg	++	
572	M				neg	++	
573	M				neg	0	
574	H				1/100	0	
575	H				1/100	0	
576	M				1/100	0	
577	H				1/100	0	
578	H				neg	0	
579	M				neg	0	
580	M				1/800	0	
581	H				neg	0	
582	M				neg	0	
583	H				neg	0	
584	M				neg	0	



...../.....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"			Cultivo	Sintomatología
		1989 <sup>1(1)</sup>	1989 <sup>(2)</sup>	1990		
107	H	1/200				0
108	H	neg		neg		0/0
109	H	neg		neg		0/0
110	H	neg		1/100		0/0
111	M	1/3200		neg		++ (exitus)
112	H	1/100				0
113	H	1/200		1/800		0/0
114	H	1/800	1/1600	neg		0/0
115	H	1/400		1/200		+/0
116	H	1/100				0
117	H	neg	neg	neg		0/0/0
118	M	1/400	1/3200	pos		++/+ (exitus)
119	M	1/200		1/200		0/0
120	M	1/400		neg		+ (exitus)
121	H			1/100		0
122	H			1/100		0
123	H			neg		0
124	H			neg		0
125	M			neg		0
126	M			1/400		0
127	H			neg		0
128	M			neg		0

7. Els Guiamets

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"		Cultivo	Sintomatologia
		1989(1)	1989(2)		
215	H	neg			0
216	M	neg			0
217	H	1/400	1/600		+/+
218	M	1/400	1/400		0/0
219	M	1/400	1/1600		++/++
220	M	1/1600	1/1600	neg	++/++
221	H	1/100			+
222	H	1/400	1/800		0/0
223	M	1/100			0
224	M	1/100			0
225	H	1/100			0
226	M	1/100			0
227	M	neg			0
228	M	1/200			0
229	M	neg			0
230	H	neg			0
231	M	neg			0
232	H	1/200			0
233	H	neg			0
234	M	neg			0
235	H	1/200	1/200		+/++
236	H	1/800	1/1600	neg	0/+
237	M	neg			0
238	H	1/400	1/200		++/+
239	M	neg			0
240	M	1/1600			++ (exitus)
241	M	neg	1/200		+/+
242	M	neg			0
243	M	1/400	1/800		0/0
					..../....

..../...

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
244	M	neg			0
245	M	1/400			0
246	H	1/100		neg	+
247	M	1/200			0

8 Falset

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)	1990		
874	M	neg		1/100		1/100		0/0/0
875	M	1/1600						0 (exitus)
876	M	1/800		1/400	1/800	1/800	neg	+ / + / + / +
877	H	neg						0
878	H	neg						0
879	H	neg						0
880	M	neg						0 (exitus)
881	M	neg				neg		0/0
882	M	neg				neg		0/0
883	H	neg				neg		0/0

..../....

...../.....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatologia
		1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)	1990		
884	M	neg				neg	0/0	
885	H	neg					0	
886	M	neg				neg	0/0	
887	M	1/100					0	
888	H	neg		1/100			0/0	
889	H	neg					+	
890	M	neg				neg	0/0	
891	H	neg		1/100		1/100	0/0/0	
892	H	neg		1/100			0/0	
893	M	neg		1/800			0/0	
894	M	1/100		1/100			0/0	
895	H	1/100		1/200		1/200	0/0/0	
896	H	1/200		1/100		1/100	0/0/0	
897	M	neg				neg	0/0	
898	H	1/100					0	
899	H	1/100					0	
900	H	1/100					0	
901	H	1/100					0	
902	M	1/100					0	
903	M	neg					0	
904	H	1/100					0	
905	H	neg				neg	0/0	
906	H	1/100					0	
907	H	1/100					0	
908	H	neg					0 (exitus)	
909	M	neg					0 (exitus)	
910	H	neg				neg	0/0	
911	M	neg					0 (exitus)	

...../.....

...../.....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)	1990		
912	H	1/100		1/100				0/0
913	M	neg						0
914	H	1/100		1/100				0/0
915	H	neg				neg		0/0
916	H	1/400				1/400		0/0
917	H	neg						0 (exitus)
918	M	1/100				1/100		0/0
919	H	1/100				1/100		0/0
920	M	1/100						0
921	M	1/400	1/400	1/400	1/400			+/0/0/0
922	H	neg						0
923	H	neg						0
924	M	1/100						+
925	H	neg				1/100		+/+
926	H	1/100						0
927	M	neg				neg		0/0
928	H	1/100		1/100				0/0
929	H	1/100						0
930	H	neg						0
931	H	1/3200		13200			neg	+/+ (exitus)
932	H	neg				neg		0/0
933	H	1/100				1/100		0/0
934	H	neg				neg		0/0
935	M	neg						+
936	H	1/100						0
937	H	1/400		1/400	1/400	1/400		0/0/+/+
938	H	1/100				1/100		0/0
939	H	1/800					neg	0
940	M	neg				1/100		0/0

...../.....

..../....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"				Cultivo	Sintomatología
		1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)		
941	H	1/100		1/100		1/100	0/0/0
942	H	neg					0
943	M	neg					0
944	M	neg					0
945	H	neg					0
946	M	1/3200		1/3200			+ / + + (exitus)
947	M	1/100				1/200	0/0
948	M	neg				neg	0/0
949	H	neg		neg			0/0
950	H	neg					0
951	H	1/1600					0 (exitus)
952	H	1/1600					0
953	M	1/100					+
954	M	neg		neg			0/0
955	H			1/100			0
956	H			neg		1/100	0/0
957	M			1/200		1/100	0/0
958	H			neg		neg	0/0
959	M			1/100		1/200	0/0
960	M			neg			0
961	H			1/100			0
962	M			1/100			0
963	H			1/200			0
964	M			1/800	1/800	1/800	neg + / + + / + +
965	M			1/100			0
966	M			1/200		1/200	0/0
967	H			1/400	1/400		neg 0 / +
968	M			1/800	1/800	1/800	pos + + / + + / + +
969	H			neg			+
970	H			neg		neg	0/0

..../....

...../.....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)	1990		
971	H			1/100				0
972	M			1/100				0
973	H			1/200				0
974	M			1/100				0
975	M			1/200				0
976	M			neg				0 (exitus)
977	H			1/400	1/6400		pos	0/++ (exitus)
978	M			neg		neg		0/+
979	M					neg		0
980	H					neg		0
981	M					1/400		0
982	M					neg		0
983	M					neg		0
984	H					1/100		0
985	H					neg		0
986	M					neg		0
987	H					1/200		+
988	H					1/200		0
989	M					1/100		+
990	H					1/200		+
991	M					1/100		0
992	H					neg		0
993	H					neg		+
994	M					neg		0
995	H					1/100		0
996	M					neg		0
997	M					1/200		0
998	M					neg		0
999	M					neg		0
1000	M					neg		0

...../.....

...../.....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)	1990		
1001	M					neg	0	
1002	M					neg	0	
1003	M					neg	0	
1004	H					neg	0	
1005	H					1/100	0	
1006	M					neg	+	
1007	H					neg	0	
1008	M					1/100	0	
1009	H					neg	0	
1010	M					1/100	0	
1011	H					1/100	0	
1012	H					1/400	0	
1013	M					neg	0	

9. Gratallops

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1988	1989		
129	M	neg			+
130	H	neg			0
131	M	1/6400			++ (exitus)
132	M	1/200	1/200		0/0

...../...

...../.....

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1988	1989		
133	H	neg			0
134	M	neg			0
135	M	neg			0
136	H	neg			0
137	M	1/200	1/100		0/0
138	H	1/400	1/100		0/0
139	M	neg			0
140	H	1/100	neg		0/0
141	M	neg			0
142	H	neg			0
143	M	neg			0
144	M	1/400	1/200		0/0
145	H	1/400			0 (exitus)
146	H	neg			0
147	H	neg			0
148	H	neg			0
149	M	neg			0
150	M	neg			0
151	M	neg			0 (exitus)
152	H	neg			0
153	M	neg			0 (exitus)
154	H	neg			0
155	M	neg			0 (exitus)
156	M	neg			0
157	H		1/100		+
158	H		neg		0
159	M		neg		0
160	M		1/400		+

...../.....

...../.....

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1988	1989		
161	M		neg		0
162	H		1/100		0
163	H		neg		0
164	H		1/100		+
165	H		neg		0
166	H		1/200		++
167	H		neg		0
168	H		neg		0
169	M		1/100		0

10 La Bisbal de Falset

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989			
270	M		neg		0
271	H		1/100		0
272	M		1/200		0
273	M		neg		0
274	H		neg		0
275	M		neg		0
276	M		neg		0

...../.....

...../.....

N°	Sexo	"Dot-ELISA" 1989	Cultivo	Sintomatología
277	H	neg		0
278	M	1/100		+
279	H	1/100		0
280	M	1/100		0
281	M	neg		0
282	M	1/100		0
283	M	1/100		+ (exitus)
284	H	neg		0
285	M	neg		0
286	H	1/200		0
287	H	1/100		0 (exitus)
288	M	neg		0 (exitus)
289	H	1/100		+

### 11 La Figuera

N°	Sexo	"Dot-ELISA" 1989(1)	1989(2)	Cultivo	Sintomatología
695	M	neg			0
696	M	1/100			0
697	M	1/200			0

...../.....

...../.....

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
698	H	1/200			0
699	M	neg			0
700	H	neg			0
701	H	1/100			0
702	H	neg			0
703	M	1/100			0
704	H	neg			0
705	M	1/100			0
706	M	1/100			0
707	M	neg			0
708	H	neg			0
709	M	neg			0
710	M	1/1600	1/1600	pos	++/++
711	H	neg			0
712	H	neg			+
713	H	neg			0
714	M	1/100			++

**12 La Morera**

N°	Sexo	<u>"Dot-ELISA"</u>		Cultivo	Sintomatología
		1988	990		
290	M	neg	neg		0/0
291	H	neg	neg		0/0
292	M	neg	neg		0/0
293	M	neg			0
294	H	neg	neg		0/0
295	H	neg			0 (exitus)
296	H	1/100	1/100		0/0
297	M	1/100	1/100		0/0
298	M	neg	neg		0/0
299	M	neg	1/1600		0/+
300	M	neg	neg		0/0
301	M	neg			0
302	H	1/100			0 (exitus)

**13 La Torre de Fontaubella**

N°	Sexo	<u>"Dot-ELISA"</u>		Cultivo	Sintomatología
		1989			
715	H	neg			0
716	M	1/400			++
717	H	1/200			0
718	M	1/100			0
719	M	1/100			0

14 Lloà

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
680	M	1/400			0
681	M	1/800	1/800	neg	+/+
682	M	1/400	1/200		0/0
683	M	1/400	1/800		+/+
684	H	neg			0
685	H	1/200			0
686	M	1/200			+
687	H	1/100			++
688	H	1/100			0
689	H	1/800	1/1600	pos	0/+
690	M	1/800	1/400	neg	+/+
691	H	1/400	1/400	neg	+/+
692	H	1/100			0
693	H	1/100			0
694	H	1/200			0

15 Marçà

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
720	H	neg			0
721	H	neg			0
722	M	neg			0
					..../...

...../.....

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
723	H	neg			0
724	M	neg			0
725	H	neg			0
726	M	1/100			+
727	H	neg			+
728	M	1/800	1/1600	pos	++/++
729	M	neg			0
730	H	neg			0
731	H	1/100			++
732	H	neg			0
733	H	1/3200			++ (exitus)
734	H	1/100			0
735	M	neg			0
736	M	1/800	1/3200	neg	+ / ++
737	M	neg			0
738	M	neg			0
739	M	1/800	1/800	pos	+ / ++
740	M	1/100			0
741	M	neg			0
742	H	neg			0
743	M	1/800			++ (exitus)
744	H	neg			0
745	H	neg			0

16 Margalef

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1988	1990		
248	M	neg	neg		0/0
249	H	neg	neg		0/0
250	H	neg			0
251	M	neg	neg		0/0
252	H	neg	1/200		0/+
253	M	neg			0
254	M	neg	neg		0/0
255	H	neg	neg		0/0
256	H	neg	neg		0/0
257	H	neg	1/200		0/0
258	H	neg	neg		0/0
259	M	neg	neg		0/0
260	M	1/100	1/200		0/0
261	M	neg	1/100		0/0 (exitus)
262	M	neg			0
263	H		1/200		0
264	H		neg		0
265	H		neg		0
266	M		neg		0
267	H		1/100		0
268	M		1/200		0
269	M		neg		0

17 Masroig

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
638	M	1/100			0
639	H	neg			0
640	H	neg			0
641	M	1/400	1/400	neg	0/+
642	H	neg			0
643	H	neg			0
644	H	neg			0
645	H	neg			0
646	M	neg			0
647	H	neg			0
648	H	neg			0
649	M	neg			0
650	H	1/100			0
651	H	neg			+
652	M	1/400	1/200	neg	+/+
653	M	neg			0
654	H	neg			0
655	H	neg			0
656	H	neg			0
657	H	neg			0
658	H	neg			0
659	M	neg			0
660	M	neg			0
661	M	1/100			0
662	M	1/200			0
663	H	neg			0
664	H	1/100			0
665	M	neg			0
666	H	1/100			0

...../.....

...../.....

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
667	M	1/100			0
668	H	1/400	1/400		+/+
669	M	1/100			0
670	M	neg			0
671	H	1/800	1/800	pos	+/0
672	M	1/200			0
673	M	1/200			0
674	H	neg			+
675	H	neg			0
676	M	1/100			0
677	M	1/200			0
678	M	1/200			0
679	H	1/200			0

18 Poboleda

N°	Sexo	IFI 1986	"Dot - E L I S A"		Cultivo	Sintomatología
			1988	1989(1)		
788	M	neg	neg			0/0
789	M	neg	neg			0/0
790	M	neg	neg	neg		0/0/0

...../.....

...../.....

N°	Sexo	IFI 1986	"Dot - E L I S A"		Cultivo	Sintomatología
			1988	1989(1) 1989(2)		
791	H	neg	neg			0/0
792	M	1/10				0
793	H	1/10				0
794	H	1/20	neg			0/0
795	H	1/20		neg		0/0
796	M	neg				0
797	H	neg				0
798	M	1/40	neg	neg		0/+/+
799	M	1/20	neg			0/0
800	M	1/20				0
801	M	neg		1/6400	pos	0/++
802	H	1/40				0
803	H	1/10				0
804	H	1/1280			pos	0 (exitus)
805	M	neg				0 (exitus)
806	M	1/40				0 (exitus)
807	H	1/20				0
808	H	neg				0
809	H	1/320			pos	0
810	H	1/10				0
811	H	1/20		neg		0/0
812	M	neg				0
813	H	1/40				0
814	M	1/20				0
815	M	neg				0
816	H	neg				0
817	H	neg				0
818	M	neg		neg		0/0

...../...

...../.....

N°	Sexo	IFI 1986	"Dot - E L I S A"		Cultivo	Sintomatología
			1988	1989 <sup>(1)</sup> 1989 <sup>(2)</sup>		
819	H	neg				0
820	H	1/40		1/400		0/0
821	H	1/10		neg		0/0
822	H	neg		neg		0/0
823	M	1/10		neg		0/0
824	M	1/20				0
825	H	1/320		1/100		0/0
826	H	1/40	1/1600			0/0 (exitus)
827	H	1/160			neg	0 (exitus)
828	H	1/320				++ (exitus)
829	H	1/320	1/6400	1/6400	pos/pos	0/+ / ++ (exitus)
830	M	1/20		neg		0/0
831	H	1/80	1/100	1/100	neg	0/0/0
832	M	1/40	1/400	1/400		0/0/0
833	M	1/40	1/400			0/++ (exitus)
834	H	neg	neg			0/0
835	M	1/640			pos	0
836	H	1/320	1/6400	1/6400	pos	0/+ / ++
837	H	neg		1/100		0/0
838	M	neg				0
839	M	1/40				0
840	M	neg		neg		0/0
841	H	1/20				0
842	H	neg		neg		0/0
843	M	1/40				0
844	H	1/20				0
845	M	1/160		1/100	pos	0/0
846	M	1/20				0 (exitus)
847	M	1/20	1/6400			0/0 (exitus)

...../.....

...../.....

N°	Sexo	IFI	"Dot - E L I S A"		Cultivo	Sintomatología	
		1986	1988	1989(1)			1989(2)
848	H		neg			0	
849	H		neg			+	
850	M		1/800			0 (exitus)	
851	H		neg			0	
852	M		1/100	neg		0/0	
853	H		1/100	1/6400	1/6400	neg	0/0/+
854	M		1/800	1/400	1/800	neg	0/0/+
855	M		neg				0
856	H		neg				0
857	M		neg				0
858	H		1/3200				+
859	M		neg				0
860	H		neg				0
861	H			neg			0
862	H			neg			0
863	M			1/100			0
864	H			neg			0
865	M			neg			0
866	H			neg			++
867	M			neg			0
868	M			neg			0
869	H			neg			0
870	H			neg			0
871	M			1/800	1/800	neg	0/+
872	M			neg			0
873	M			neg			0



..../....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1988 <sup>(1)</sup>	1988 <sup>(2)</sup>	1989 <sup>(1)</sup>	1989 <sup>(2)</sup>	1990		
30	H	1/200	1/1600				neg	0/+ (exitus)
31	M	neg				neg		0/0
32	H	neg				neg		0/0
33	H	neg				1/200		0/0
34	M	neg						0
35	H	neg				1/200		0/+
36	M	neg				neg		0/0
37	H	neg				neg		0/0
38	H	neg				neg		0/0
39	H	1/200	1/200			1/200	neg	0/0/0
40	M	neg						0 (exitus)
41	M	1/100						0 (exitus)
42	M	neg						0 (exitus)
43	M	1/100						++ (exitus)
44	M	1/100						0
45	M	1/6400					pos	++ (exitus)
46	H			neg		neg		0/0
47	H			1/100				++
48	M			1/100				+
49	H			1/100				0
50	H			1/100				0
51	M			neg				0
52	H			1/100	1/100			++/++
53	M			1/200	1/200			0/0
54	H			1/100	1/100			0/0
55	H					neg		0
56	M					1/100		0
57	H					1/100		0
58	H					neg		0

..../....

...../.....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)	1990		
59	H					1/200	0	
60	M					1/400	0	
61	M					neg	0	
62	H					neg	0	
63	M					1/100	0	
64	M					1/100	0	
65	M					1/200	0	
66	H					neg	0	
67	H					1/100	0	
68	H					1/200	0	
69	M					1/200	+	
70	H					neg	0	
71	H					1/200	0	
72	M					neg	0	
73	H					1/200	0	
74	H					1/100	0	
75	M					1/3200	++	
76	M					1/400	+	
77	M					1/400	0	

20 Pradell de la Teixeta

N°	Sexo	"Dot-ELISA"		Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)		
389	H	neg			0
390	M	neg			0
391	H	neg			0
392	M	1/200			0
393	M	1/100			0
394	H	1/100			0
395	H	1/100			0
396	H	1/100			0
397	M	neg			0
398	M	neg			0
399	H	1/6400			0
400	H	1/100			0
401	M	neg			+
402	H	1/200	1/200		0/++
403	M	neg			0
404	H	neg			0
405	M	1/100			0
406	M	neg			0
407	H	1/200			0
408	M	neg			0
409	M	1/800	1/1600		0/0
410	M	neg			0
411	H	neg			0
412	M	1/6400		neg	++ (exitus)
413	H	1/100			0
414	H	1/100			0
415	M	1/100			+
416	H	neg			+
417	H	1/100			+
418	H	neg			0

21 Scala Dei

N°	Sexo	"Dot-ELISA"			Cultivo	Sintomatología
		1988	1989	1990		
303	H	neg		neg		0/0
304	H	1/200		1/200		0/+
306	H	1/200				0
307	M	1/3200	1/3200		pos	0/0 (exitus)
308	H	neg				0
309	M	neg				0
310	M	1/3200				0 (exitus)
311	H	neg				0
312	H	neg				0
313	H	neg				0
314	M	neg				0 (exitus)
315	M			neg		0
316	M			neg		0
317	H			neg		0

22 Torroja

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1987	1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)		
419	H	1/400	1/100				neg	+/0
420	M	1/200	1/200		1/200	1/400	neg/neg	0/0/0/0 ...../....

.... / ....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1987	1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)		
421	H	neg						0
422	M	1/100	1/100		1/100			0/0/0
423	H	1/400	1/400		1/200	1/200	pos	0/0/0/0
424	H	1/400						0 (exitus)
425	H	neg	neg		neg	1/100		0/0/0/+
426	M	1/400	1/200		1/200		neg	+/0/0 (exitus)
427	H	1/200						0
428	H	1/400	1/200		1/200	1/800	neg	0/+/0/++
429	M	1/400	1/800		1/1600		pos/pos	0/+/++ (exitus)
430	M	neg	neg		neg	neg		0/0/0/0
431	H	1/400					neg	++
432	H	1/100					neg	+ (exitus)
433	H	neg	1/200				neg	0/0
434	H	1/400					neg	+ (exitus)
435	H	1/200	1/200		1/400	1/800	neg/neg	0/0/+/+
436	H	1/1600					pos	++
437	M	1/100	1/100		1/800		pos	0/0/++ (exitus)
438	H	neg	neg		1/200	1/200		0/0/0/0
439	H	neg	neg		neg	1/800		0/0/0/0
440	H	1/400	1/200		1/200		neg	0/0/0/+
441	H	neg	neg		neg	neg	neg	0/0/0/0
442	M	1/200					neg	+
443	M	1/400						0
444	H	1/800	1/800		1/800		pos	+/+/+
445	M	1/800	1/400		1/200	1/200	neg/neg	+/+/+/+
446	M	1/800	1/400		1/200	1/100	neg/neg	+/+/+/+
447	H	1/400					pos	++
448	H	1/400	1/6400				pos	0/++ (exitus)

.... / ....

...../.....

N°	Sexo	"Dot - E L I S A"					Cultivo	Sintomatología
		1987	1988(1)	1988(2)	1989(1)	1989(2)		
449	H	1/400	1/800		1/400		neg	0/+ / ++
450	M	1/800	1/100	1/200	1/100		neg	0/0/0/+
451	M		1/200	1/100	1/100	1/100		0/0/0/0
452	M		1/800		1/1600		pos	0/++
453	M		1/200		1/400			0/0
454	M		neg				neg	0
455	H		neg			1/100		0/0
456	H		neg		neg	neg	neg	0/0/0
457	H		1/200		1/200	1/1600		0/0/0
458	H		1/800		1/800		neg/neg	+ / ++ (exitus)
459	M		1/1600		1/1600			+ / ++ (exitus)
460	M		1/100		1/200		neg	0/0
461	H		1/6400				pos	++ (exitus)
462	H				neg	1/100		0/0
463	H				neg	1/100		0/0
464	H				neg			0
465	M				1/100			0
466	H				1/200	1/800		0/+
467	H					1/200		+
468	H					neg		0
469	H					neg		+
470	H					1/100		0
471	H					1/200		0

23 Ulldemolins

N°	Sexo	"Dot-ELISA" 1989	Cultivo	Sintomatología
318	H	1/100		0
319	M	1/100		0
320	H	1/100		0
321	H	1/100		0
322	M	1/100		0
323	M	1/100		0
324	M	1/100		0
325	H	neg		0
326	M	neg		0
327	H	1/100		0
328	M	neg		0
329	M	1/100		0
330	M	neg		0
331	M	neg		0
332	H	neg		0
333	M	1/100		+
334	H	neg		0
335	M	neg		0
336	M	1/100		0
337	H	1/100		0
338	M	neg		0
339	H	neg		0
340	M	neg		++
341	H	neg		0
342	M	1/100		0
343	M	neg		0
344	H	1/200		0
345	M	1/200		0

...../.....

...../.....

N°	Sexo	<u>"Dot-ELISA"</u> 1989	Cultivo	Sintomatología
346	H	neg		0
347	H	1/200		0
348	M	1/200		0
349	M	1/200		0
350	M	neg		0
351	M	1/100		0
352	M	1/100		0
353	H	1/100		0
354	H	1/100		0
355	H	1/100		0

**24 Vilella Alta**

N°	Sexo	<u>IFI</u> 1986	<u>"Dot-ELISA"</u> 1989	Cultivo	Sintomatología
1014	H	1/20			0
1015	H	neg			0
1016	H	1/80			0 (exitus)
1017	M	neg			0
1018	H	1/80			0 (exitus)
1019	M	1/320			0 (exitus)
1020	M	1/20			0
1021	H	1/10			0
1022	M	1/20			0
1023	M	1/40			0 (exitus)

...../.....

...../...

N°	Sexo	<u>IFI</u>	<u>"Dot-ELISA"</u>	Cultivo	Sintomatología
		1986	1989		
1024	M	neg			0
1025	M	neg			0
1026	H	neg			0
1027	M	1/10			0
1028	H	neg			0
1029	M	1/80			0
1030	M	1/20			0
1031	H	1/10			0
1032	H	neg			0
305	H	neg			0
765	-		1/200		0
766	-		1/100		0
767	-		neg		0
768	-		neg		0
769	-		neg		0
770	-		1/100		0
771	-		neg		0
772	-		neg		0
773	-		neg		0
774	-		neg		0
775	-		1/100		0
776	-		1/100		0
777	-		neg		0
778	-		neg		0
779	-		neg		0
780	-		neg		0
781	-		1/100		0
782	-		1/800		0
783	-		1/100		0
784	-		1/200		0
785	-		neg		0
786	-		1/100		0
787	-		neg		0

25 Vilella Baira

N°	Sexo	IFI	"Dot-ELISA"			Cultivo	Sintomatología
			1986	1989(1)	1989(2)		
356	M	1/20	neg				0/0
357	H	1/10	1/400		1/400		0/+/+
358	M	1/10					0
359	H	1/10	1/100		1/400		0/0/0
360	M	neg	neg				0/0
361	M	1/10	1/200		1/200		0/+ /0
362	H	1/10	1/100				0/+
363	H	1/10			1/200		0/0
364	M	1/20	1/800		1/800		0/0/0
365	M	1/80					++ (exitus)
366	M	1/20	1/400	1/400	1/1600		0/0/0/+
367	H	1/10	1/200		1/400		0/+ /0
368	M	neg					0
369	H	neg	1/100		1/200		0/0/0
370	H	1/20					0 (exitus)
371	H	1/20	1/800		1/800		0/0/0
372	M		neg		1/200		0/0
373	M		1/400	1/400	1/800		0/0/0
374	H		neg		1/100		0/0
375	H		1/100				0
376	H		1/100				0 (exitus)
377	M		1/100		1/200		0/0
378	H		1/100				0
379	M		1/200		1/200		0/0
380	M		1/400		1/400		0/+
381	H		neg				+
382	H		neg		neg		0/0
383	H		neg		neg		0/0
384	H		1/200		1/800		0/+

...../.....

...../.....

N°	Sexo	IFI 1986	"Dot-ELISA"			Cultivo	Sintomatología
			1989(1)	1989(2)	1990		
385	H		1/400		1/800		0/+
386	M		1/200	1/200	1/400	neg	+/+/+
387	M				neg		0
388	H				1/100		0

26 La Venta del Pubill

N°	Sexo	"Dot-ELISA"			Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)	1990		
1033	H	1/100				0
1034	H	neg				0
1035	H	1/100	1/200		neg	0/0
1036	M	neg				0
1037	M	1/800	1/1600		pos	+/+/+
1038	H	1/100				0
1039	M	1/200	1/200		neg	+/+/+
1040	H	1/100	1/100		neg	0/+
1041	H	neg				0
1042	H	1/100	1/200			0/+
1043	M	neg	1/100		neg	0/0
1044	M	1/200			neg	++
1045	M	1/800				++
1046	M	1/100				0

...../.....

.....

N°	Sexo	"Dot-ELISA"			Cultivo	Sintomatología
		1989(1)	1989(2)	1990		
1047	H	neg				0
1048	M	1/1600			neg	++ (exitus)
1049	H	1/200		1/200		0/0
1050	M	1/100				0
1051	M	neg		neg		0/0
1052	H	1/100		1/200		0/0
1053	H	1/400			neg	++
1054	M	1/6400		1/6400	neg	++/+
1055	H	neg				0 (exitus)
1056	H	1/400				0 (exitus)
1057	M	1/3200			neg	++ (exitus)
1058	H	1/6400			neg	+
1059	M	neg				0
1060	M	1/200				0
1061	H			1/100		0
1062	H			1/100		++
1063	H			1/3200		+
1064	H			neg		0
1065	H			neg		0
1066	H			1/3200		0
1067	M			1/1600		0

Tabla 9. Presentación del conjunto de resultados obtenidos de los perros estudiados en las distintas localidades de la comarca.

N°: número de identificación de animal.

Cultivo: cultivo ganglionar.

#### IV.2.2. DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Durante los años 1985 y 1986 se utilizó como técnica diagnóstica la IFI, técnica ampliamente utilizada en nuestro Laboratorio para el estudio de la leishmaniosis canina (Botet y col., 1987; Portús y col. 1987a). A partir de ese año se ha utilizado la técnica "Dot-ELISA"-Proteína A-PO descrita por Pappas y col. (1983b), para el diagnóstico del Kala-azar humano, y adaptada por nosotros al estudio de la leishmaniosis canina (IV.1.2.3.2.A.2., pag.72).

El resumen de los resultados serológicos obtenidos en el conjunto de la población según los títulos serológicos para cada una de las técnicas utilizadas, IFI y "Dot-ELISA", se indica en la Tabla 10.

Títulos IFI	N° muestras	Títulos "Dot-ELISA"	N° muestras
neg	97	neg	604
1/10	16	1/100	286
1/20	23	1/200	178
1/40	13	1/400	104
1/80	6	1/800	77
1/160	2	1/1600	30
1/320	6	1/3200	19
≥1/640	2	≥1/6400	30
Totales	165		1328

Tabla 10. Resultados serológicos obtenidos del conjunto de muestras estudiadas al aplicar la técnica IFI y la técnica "Dot-ELISA".

#### IV.2.2.1. Elección del título diagnóstico "Dot-ELISA"

La elección del título diagnóstico se basa en determinar aquellos valores que permiten obtener la máxima sensibilidad y especificidad.

##### a) Comparación de los resultados serológicos "Dot-ELISA" con los resultados obtenidos por IFI.

La inmunofluorescencia indirecta es una técnica serológica ampliamente utilizada y bien estandarizada para el estudio de la leishmaniosis canina y humana (Lanotte, 1975; Gradoni y col., 1980), en la que se aceptan como títulos diagnósticos de una infección por Leishmania valores que oscilan entre 1/40-1/160, según los distintos autores (Rioux y col., 1972b; Lanotte, 1975; Pozio y col. 1981a), considerándose en nuestro Laboratorio como valor diagnóstico 1/80 (Botet y col., 1987; Portús y col., 1987a) .

La técnica "Dot-ELISA" -Proteína A, desarrollada para la determinación de IgG anti-Leishmania (IV.1.2.3.2.A.2., pag.72 ), se ha comparado con la técnica de IFI (IV.1.2.3.2.A.1., pag.68 ). Se han estudiado, en paralelo por ambas técnicas, 70 muestras de suero canino, elegidas de modo que fuesen representativas de los distintos títulos de anticuerpos que pueden obtenerse en una población.

En la Fig. 12, se expresan gráficamente los resultados "Dot-ELISA" frente a los obtenidos mediante la IFI. Se observa que la mayor parte de los sueros que poseían mediante IFI título 1/80, título límite diagnóstico, alcanzan mediante "Dot-ELISA" el título 1/800. (Anexo 1)

Mediante la aplicación del test de Kendall (Anexo 6) se prueba la existencia de asociación significativa entre los dos métodos de diagnóstico ensayados, IFI y "Dot-ELISA", con un coeficiente de correlación lineal  $\tau=0.815$ ,  $\alpha > 0.05$ .

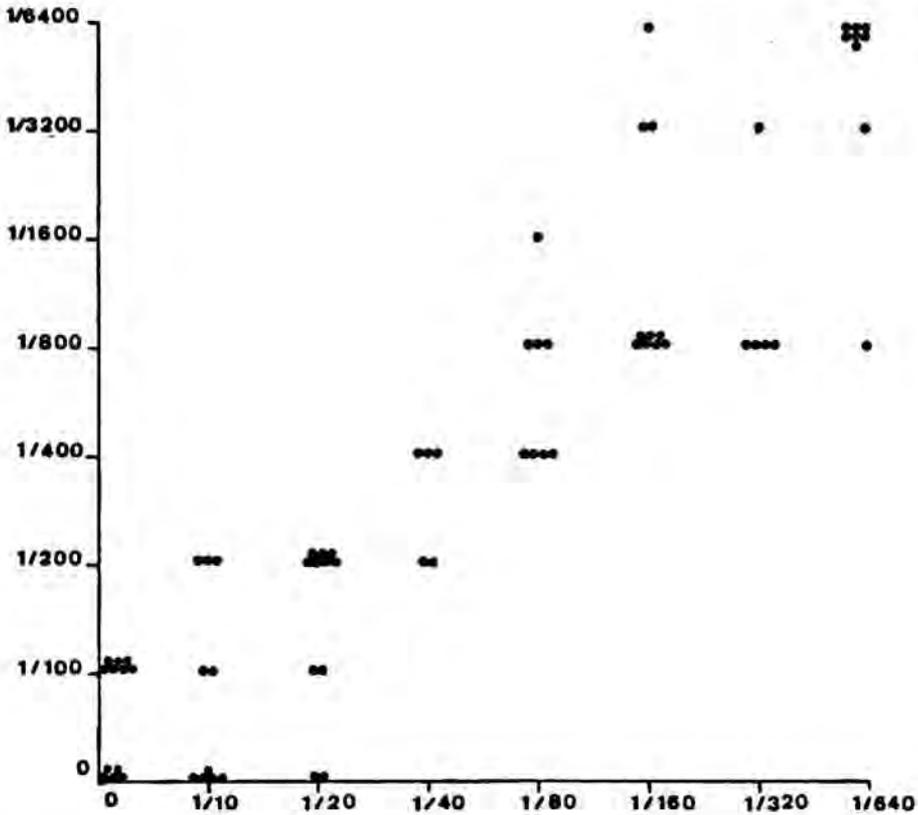


Fig.12. Resultados serológicos de 70 muestras estudiadas por "Dot-ELISA" e IFI en paralelo.

b) Comparación de los resultados serológicos "Dot-ELISA" con el diagnóstico etiológico.

La visualización del agente etiológico es el único método diagnóstico que expresa con certeza la presencia del parásito. Sin embargo, la negatividad del examen no excluye su existencia, por lo que no puede descartarse la parasitación.

En la Tabla 11 se indican los títulos serológicos "Dot-ELISA" observados en los animales en los que se han realizado cultivos ganglionares, expresándose el número de cepas de Leishmania aisladas sobre el total de cultivos realizados.

"Dot-ELISA" Títulos	C. positivo C. realizado	F (%)	F. acumulada (%)
neg	0/4	0	0
1/100	0/8	0	0
1/200	0/14	0	0
1/400	3/25	12.0	9.7
1/800	8/20	40.0	35.5
1/1600	8/13	61.5	61.3
1/3200	4/8	50.0	74.2
≥ 1/6400	8/15	53.3	100
Totales	31/107	29.0	100

Tabla 11. Relación entre los títulos serológicos "Dot-ELISA" hallados y los cultivos ganglionares realizados.

C: cultivo ganglionar; F: frecuencia

La frecuencia de aislamientos de cepas de Leishmania se ha mantenido prácticamente constante a títulos  $\geq 1/800$ , oscilando alrededor del 50% de positividad. Destaca el 12% de positividad hallado en animales con título serológico 1/400, y el porcentaje nulo de positividad en los animales con títulos  $\leq 1/200$ .

Autores como Pozio y col. (1981a) escogen como título diagnóstico el valor mínimo que corresponde el diagnóstico etiológico. Sin embargo, en nuestro estudio, a la vista de los resultados, se ha considerado como título límite de positividad el valor 1/800, aceptando la

pérdida de un número bajo de positivos a títulos inferiores, con especial importancia a 1/400.

c) Elección del título diagnóstico mediante un método global.

En zona endémica autores como Kagan y col. (1969) indican como método global para determinar el título diagnóstico, al utilizar un técnica inmunológica de detección de anticuerpos, la repartición "bimodal" que siguen los títulos en la población. Al representar gráficamente los títulos serológicos se escoge el punto de inflexión como el título diagnóstico a considerar.

Al aplicar este criterio global sobre los resultados serológicos "Dot-ELISA" obtenidos del conjunto de la población canina del Priorato, no ha aparecido con claridad la distribución bimodal esperada (Fig. 13), por lo que este método no ha permitido discernir el título diagnóstico. Los resultados serológicos hallados por la técnica de IFI, en nuestro foco (Fig. 14), tampoco han seguido esta distribución particular, en contraposición a los hallazgos de Lanotte (1975), también en zona endémica.

Por todo ello se considera el título 1/800 como el límite inferior que detecta una leishmaniosis evolutiva. Sin embargo, también se desprende el peligro que conlleva fijar límites ya que comporta el riesgo de perder títulos bajos de anticuerpos que pueden ser reflejo de leishmaniosis debutantes, crípticas o en fase de recesión.

Se estima, por lo tanto, conveniente realizar siempre la titulación completa de los sueros, para obtener la máxima información y poder seguir la evolución de los animales, en especial del grupo de animales serológicamente dudosos.

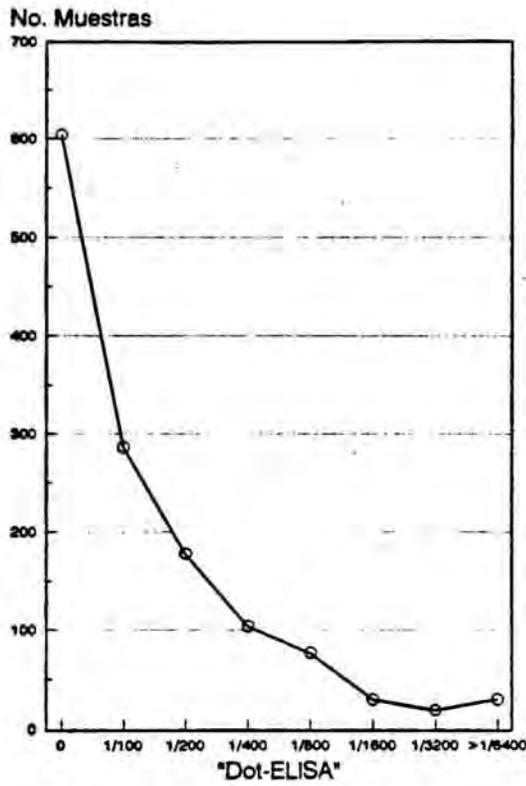


Fig. 13. Resultados serológicos "Dot-ELISA" de los perros estudiados considerando los resultados serológicos de cada año.

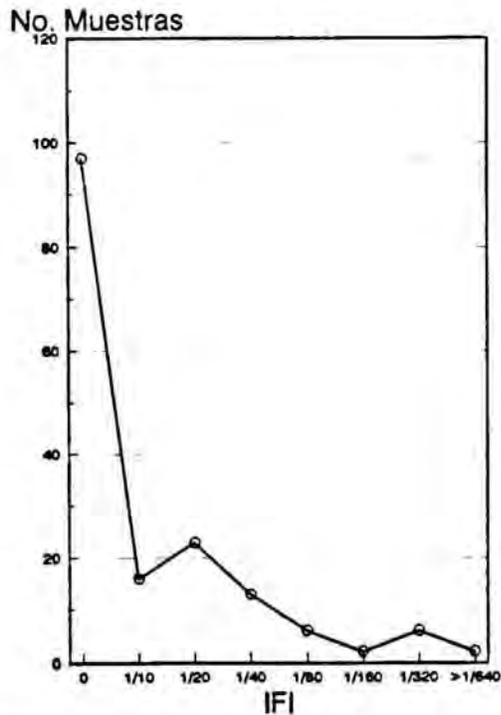


Fig. 14. Resultados serológicos IFI de los perros estudiados considerado los resultados serológicos de cada año.

#### IV.2.2.2. Sensibilidad y especificidad "Dot-ELISA"

La sensibilidad de la técnica, aceptando como título diagnóstico  $\geq 1/800$ , es muy alta 90.3%.

Se ha calculado sobre 31 perros, con leishmaniosis confirmada por el hallazgo del parásito en el cultivo ganglionar, cuyos títulos serológicos oscilaban entre 1/400 - 1/6400 (IV.2.2.1.b., pag.132).

	Positivos ciertos	28
Sensibilidad = -----		S = -----= 0.90
	Positivos ciertos + Falsos negativos	28+3

Representando gráficamente la sensibilidad que se obtiene tomando como criterio frontera los distintos títulos serológicos, aparece el título 1/800 como la inflexión en la curva de sensibilidad (Fig.15).

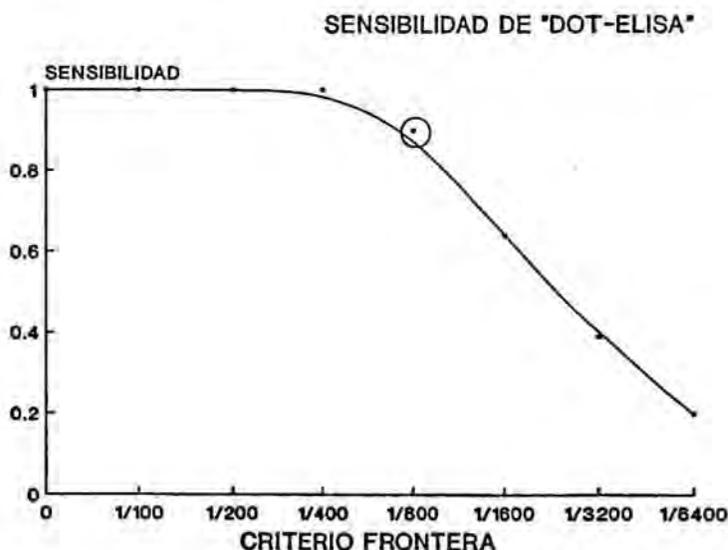


Fig. 15. Sensibilidad "Dot-ELISA"

La especificidad es totalmente comparable a la estimada para la técnica de IFI (Lanotte, 1975) como se observa al analizar los resultados expresados en el apartado IV.2.2.1.a., pag.131.

**IV.2.3. RELACION DIAGNOSTICO SEROLOGICO "Dot-ELISA"  
- DIAGNOSTICO CLINICO - DIAGNOSTICO ETIOLOGICO**

En la Tabla 12 se observa la relación existente entre los resultados serológicos obtenidos mediante la técnica "Dot-ELISA", expresada en títulos, el diagnóstico clínico según los criterios expuestos en el apartado IV.1.2.1. (pag. 57 ) y los resultados de los cultivos ganglionares. La tabla resume los datos obtenidos de cada uno de los perros, durante los diversos años, considerándolos como independientes.

Títulos "Dot-ELISA"	<u>S i n t o m a t o l o g í a</u>							
	0		+		++		Total	
	N°	Cepas/Cultivo	N°	Cepas/Cultivo	N°	Cepas/Cultivo	N°	Cepas/Cultivo
neg	560	0/3	39	0/1	5	0/0	604	0/4
1/100	247	0/5	31	0/3	8	0/0	286	0/8
1/200	141	0/6	28	0/5	8	0/3	177	0/14
1/400	59	2/5	34	0/14	12	1/6	105	3/25
1/800	29	1/2	32	3/12	16	4/6	77	8/20
1/1600	7	0/1	8	2/4	15	6/8	30	8/13
1/3200	3	1/1	8	2/3	8	1/4	19	4/8
≥1/6400	8	1/2	6	1/3	16	6/10	30	8/15
<b>Totales</b>	<b>1054</b>	<b>5/25</b>	<b>186</b>	<b>8/45</b>	<b>88</b>	<b>18/37</b>	<b>1328</b>	<b>31/107</b>

Tabla 12. Resultados serológicos "Dot-ELISA", sintomatología y resultados de los cultivos.

N°: número de perros; Cepas/cultivo: cepas de Leishmania aisladas/cultivos ganglionares realizados; 0= asintomático; +: oligosintomático; ++: sintomático.

En 156 análisis se han obtenido serologías significativas  $\geq 1/800$ , correspondientes a perros con distintos grados de afectación clínica. Con total ausencia de clínica, grupo de los asintomáticos, se han detectado 47 casos (30.1%), con una positividad importante en sus cultivos ganglionares (3 cepas de Leishmania aisladas sobre 6 cultivos realizados) y con un valor serológico medio calculado como la media geométrica (TGM) del inverso de los títulos de 1361 (Anexo n° 6). En el grupo de los oligosintomáticos se han enmarcado 54 casos (34.6%), con 8 aislamientos sobre 22 cultivos y TGM= 1365. En el grupo de los sintomáticos, se han contabilizado 55 casos (35.3%), con el mayor porcentaje de positividad en sus cultivos ganglionares (17 cepas aisladas sobre 28 cultivos) y TGM=2160. Al observar la sintomatología y los valores serológicos alcanzados, expresados por su media geométrica, se detecta una tendencia muy pequeña a aumentar los títulos al incrementar la clínica, con un aumento aproximado de un título del grupo de los animales sintomáticos.

Con serologías positivas bajas, poco significativas, con títulos que oscilan entre 1/100 - 1/400, se han detectado 568 casos. Según su sintomatología se han distribuido en asintomáticos (78.7%), TGM = 149; oligosintomáticos (16.4%), TGM = 205, y sintomáticos (4.9%), TGM = 221. Se ha podido demostrar la presencia de Leishmania en tres casos, siempre con título serológico 1/400 muy próximo al título diagnóstico y con sintomatología variable.

Con serología totalmente negativa han aparecido 604 casos. Un pequeño número han presentado sintomatología muy sospechosa de leishmaniosis (0.8%). Otro pequeño grupo ha mostrado sintomatología poco específica, compartida con otras enfermedades, encuadrados en el grupo de los oligosintomáticos (6.5%). La mayoría, el 92.7% de los casos,

no han presentado ningún síntoma clínico relacionado con una leishmaniosis. En ninguno de los casos los cultivos ganglionares han resultado positivos.

#### IV.2.4. PREVALENCIA DE LA PARASITOSIS EN LA COMARCA.

Para conocer la prevalencia de la enfermedad se han tenido en cuenta los resultados hallados en las distintas poblaciones durante los años 1988, 1989 y 1990, donde se engloban la mayor parte de los animales estudiados, que se especifican en el apartado IV.2.8.1.A., pag. 159 ya que se acepta que los focos de leishmaniosis canina se mantienen constantes durante largo tiempo (Lanotte, 1975; Bettini y Gradoni, 1986a).

Al desglosar los resultados según los títulos (Tabla 13), aparece un 10.2% de animales seropositivos con título  $\geq 1/800$ , que representa la prevalencia encontrada en la zona, junto a un 40% de animales con serologías bajas y un 49.8% de animales totalmente negativos.

---

"Dot-ELISA" (Títulos)	neg	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	$\geq 1/6400$
N° animales (1169)	582	257	149	62	51	27	15	26
Frecuencia acumulada (%)	49.8	71.8	84.5	89.8	94.2	96.5	97.8	100

---

Tabla 13. Distribución de los animales según sus títulos serológicos.

#### IV.2.5. ESTUDIOS DE INCIDENCIA

La incidencia anual de nuevos casos de leishmaniosis en la población canina se ha determinado examinando dos grupos de animales: Grupo I, formado por animales jóvenes nacidos antes de la época de transmisión (110), y Grupo II donde se incluyen los animales adultos que habían sido controlados, con resultado negativo, antes de la época de transmisión (265). Los estudios se han realizado siempre transcurridos como mínimo cuatro meses después de la estación estival, que es el tiempo de incubación estimado (Lanotte y col., 1979; Gradroni y col., 1988). Generalmente se ha realizado el control hacia el mes de mayo, justo antes del inicio del nuevo período de transmisión.

La incidencia anual observada en el conjunto de la comarca del Priorato al considerar los dos grupos, después de los controles realizados durante los años 1988-1989-1990, se sitúa en 5.7%. Al desglosar los resultados no aparecen diferencias significativas entre los dos grupos ya sean jóvenes o adultos ( $\epsilon = 0.192$ ) (Anexo n° 6).

---

Grupo I	Incidencia	5.3%
Grupo II	Incidencia	5.8%

---

#### IV. 2.6. ESTUDIO DE EVOLUCION DE LOS ANIMALES EN EL TIEMPO.

En la Tabla 9, pag. 86, se expresa el conjunto de los resultados serológicos clínicos y parasitológicos obtenidos en el tiempo, para cada uno de los animales estudiados. Los controles se han realizado en tiempos diferentes con períodos que han oscilado desde meses hasta varios años.

Para conocer la evolución serológica y clínica de estos animales se han realizado diversos estudios de seguimiento en el tiempo.

#### IV.2.6.1. Evolución espontánea de los animales con títulos serológicos elevados.

##### A. En el período de un año

Para observar la evolución serológica y clínica se ha estudiado un grupo de 68 animales (Anexo 3), considerados afectados de leishmaniosis por la detección previa en suero de niveles significativos de anticuerpos anti-Leishmania. Los animales se han controlado después del período aproximado de un año, mediante un análisis serológico y la observación de su estado clínico general.

##### A.1. Estudio serológico

En la Tabla 14 se expresa la evolución serológica experimentada en el período aproximado de un año, indicándose además los animales que han sido exitus en este tiempo.

Serología previa	Control subsiguiente (Aprox. 1 año)								Exitus
	neg	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	
1/800	-	-	1	4	16	8	2	-	3/34
1/1600	-	-	-	-	-	3	-	-	6/9
1/3200	-	-	-	-	-	-	3	-	5/8
≥1/6400	-	-	-	-	-	-	1	6	10/17

Tabla 14. Evolución serológica en el período de un año.

En la Fig. 16 se presenta la evolución serológica de los 44 animales controlados al cabo de un año, después de eliminar los animales que habían sido exitus en este período. Los títulos serológicos están correlacionados positivamente (Test de Kendall  $\tau = 0.704$ ,  $\alpha \leq 0.05$ ) y no presentan homogeneidad en la tendencia central (Test de Wilcoxon  $Z = 1.913$ ,  $\alpha > 0.05$ ).

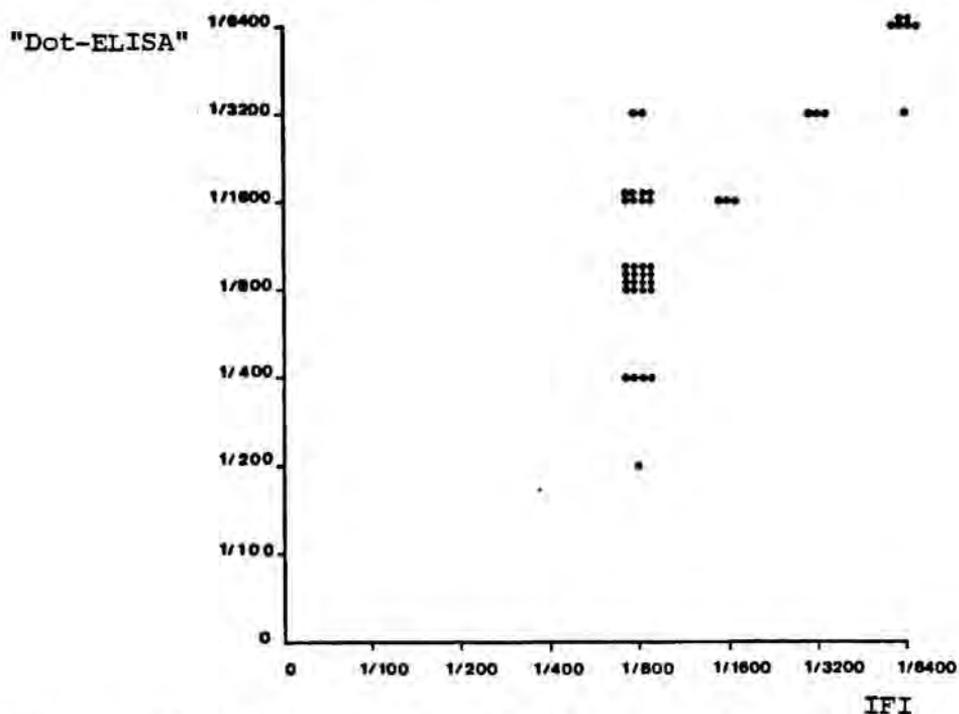


Figura 16. Evolución serológica en el período de un año.

Los animales con títulos elevados 1/1600 - 1/3200 - 1/6400, han mantenido su titulación inicial, si bien una proporción muy elevada, aproximadamente 1/3 de los animales, ha sido exitus en este período.

En el grupo de los animales con título inicial 1/800, título límite diagnóstico, se ha observado una evolución más heterogénea. La mortalidad ha sido más baja, reduciéndose al 10% de los casos, y la evolución serológica más dispar. El 50% de los animales han mantenido sus títulos, el 30% han mostrado tendencia a aumentarlos y el 15% tendencia a disminuirlos, aunque tan solo en un caso (3%), ha sido un descenso significativo (mínimo dos diluciones).

## A.2. Estudio clínico

En la Tabla 15, se indica la evolución clínica sufrida en el tiempo de un año, por el grupo anterior de animales, diagnosticados serológicamente y clasificados según su sintomatología en animales con sintomatología clara (23), animales oligosintomáticos (23) y animales asintomáticos (22). Se indica además los animales que han fallecido en este período, presumiblemente a causa de la enfermedad.

Controles subsiguientes (aprox. 1 año)

	Asintomático		Oligosintomático		Sintomático		Exitus	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Sintomático (23)	0	0	1	4.3	7	30.4	15	65.2
Oligosintomático (23)	1	4.3	8	34.8	12	52.2	2	8.7
Asintomático (22)	8	36.4	6	27.3	1	4.5	7	31.8

Tabla 15. Evolución clínica en el período de un año.

Destacan dos tendencias:

- Evolución lenta de los síntomas que llevaría a los animales a padecer las distintas fases de la enfermedad descritas: asintomática, oligosintomática y sintomática, para terminar llevando al animal a la muerte en varios años (Evolución crónica).

- Evolución clínica rápida, observada en el 31.8% de los animales asintomáticos que son exitus en el período de un año.

La regresión en la sintomatología, en el conjunto de animales estudiados, ninguno de ellos sometido a tratamiento, es inapreciable.

#### B. En el período de varios años

Entre los animales considerados afectados de leishmaniosis, ya sea por su serología o por el aislamiento del parásito, al ampliar el período de control a varios años, aparece un pequeño grupo que presenta un nuevo comportamiento: la regresión espontánea de la enfermedad. Estas formas resolutivas o regresivas han sido anteriormente citadas por varios autores (Lanotte y col. 1979; Pozio y col., 1981a), entre animales asintomáticos con títulos serológicos significativos.

El estudio se ha realizado sobre un conjunto de animales varias veces controlados durante dos, tres o más años en los que se ha observado la evolución serológica y la evolución clínica. La población afecta, clasificada según su clínica, se ha distribuido en dos grupos: población sintomática y población asintomática, donde se han incluido los animales oligosintomáticos.

La mayor parte de los animales sintomáticos han muerto durante el período de control, como se esperaba según los resultados anuales expuestos anteriormente en la Tabla 15. Los animales asintomáticos han evolucionado clínicamente hacia formas sintomáticas (85%), en períodos muy variables desde unos meses (Tabla 9, ej. animal n° 452), hasta varios

año (Tabla 9, ej. animal n° 19, 836, 854) como asimismo se plasmaba en la Tabla 15. Sin embargo, un grupo reducido de animales (15%) ha sufrido una evolución distinta orientada hacia la regresión de la infestación (Fig. 17).

Las formas regresivas o de resolución espontánea se han observado en 7 animales con títulos serológicos significativos y/o cultivo positivo (Tabla 9, animal n° 423, 445, 446, 450, 825, 831, 845) en los que se ha detectado una disminución serológica importante sin llegar a negativizar a lo largo del tiempo, y sin sintomatología clara en ningún momento. En dos casos pudo demostrarse la presencia del parásito en el primer examen (Tabla 9, animal n° 423, 845).

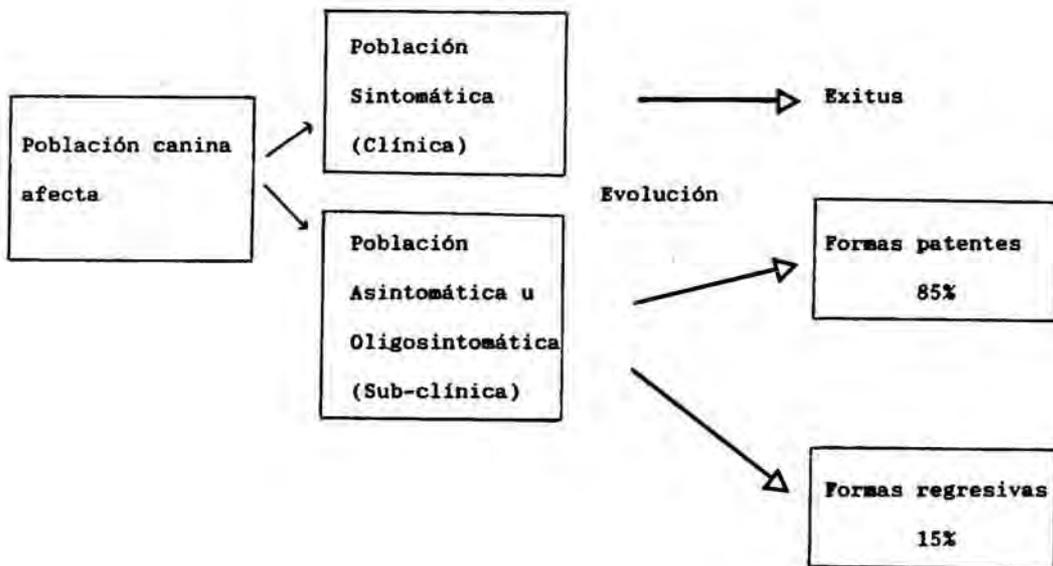


Fig. 17. Evolución clínica esquemática de la población canina positiva (títulos de anticuerpos  $\geq 1/800$  y/o cultivo positivo), de acuerdo con los resultados obtenidos.

E.C: Evolución crónica; E.A: Evolución aguda.

**IV.2.6.2. Evolución espontánea de los animales con títulos bajos poco significativos.**

**A. Estudio serológico**

Se ha estudiado un grupo de 52 animales con serologías iniciales bajas, controlándose después de un período aproximado de seis meses, el cual se ha realizado en los meses de Septiembre-Octubre en plena época de riesgo epidemiológico de transmisión de la parasitosis (Anexo 4).

En la Tabla 16, se refleja la variación en los títulos de anticuerpos, considerando tan solo significativo la oscilación mínima de dos títulos, e indicando entre paréntesis los títulos finales alcanzados.

Título Inicial	Evolución serológica			
	0	△	(Título final)	▽
neg	5/6	1/6	( 1/200 )	0/6
1/100	7/8	1/8	( 1/400 )	0/8
1/200	11/12	1/12	( 1/1600 )	0/12
1/400	21/26	5/26	( ≥1/1600 )	0/26
<b>Total</b>	<b>44/52</b>	<b>8/52</b>		<b>0/52</b>

Tabla 16. Variación de las tasas de anticuerpos en animales con títulos serológicos bajos durante el período de control.  
 0: no variación significativa del título de anticuerpos;  
 △: aumento significativo del título de anticuerpos (mínimo dos titulaciones); ▽: descenso significativo del título de anticuerpos (mínimo dos titulaciones).

En la Fig. 18 se representan gráficamente los títulos de anticuerpos en el segundo control respecto a los títulos que poseían estos mismos animales en el primer control. Los títulos serológicos están correlacionados positivamente (coeficiente de concordancia Kendall  $\tau = 0.070$ ,  $\alpha > 0.05$ ) y no mantienen homogeneidad en su tendencia central (Prueba "T" de Wilcoxon  $Z = 1.913$ ,  $\alpha > 0.05$ ).

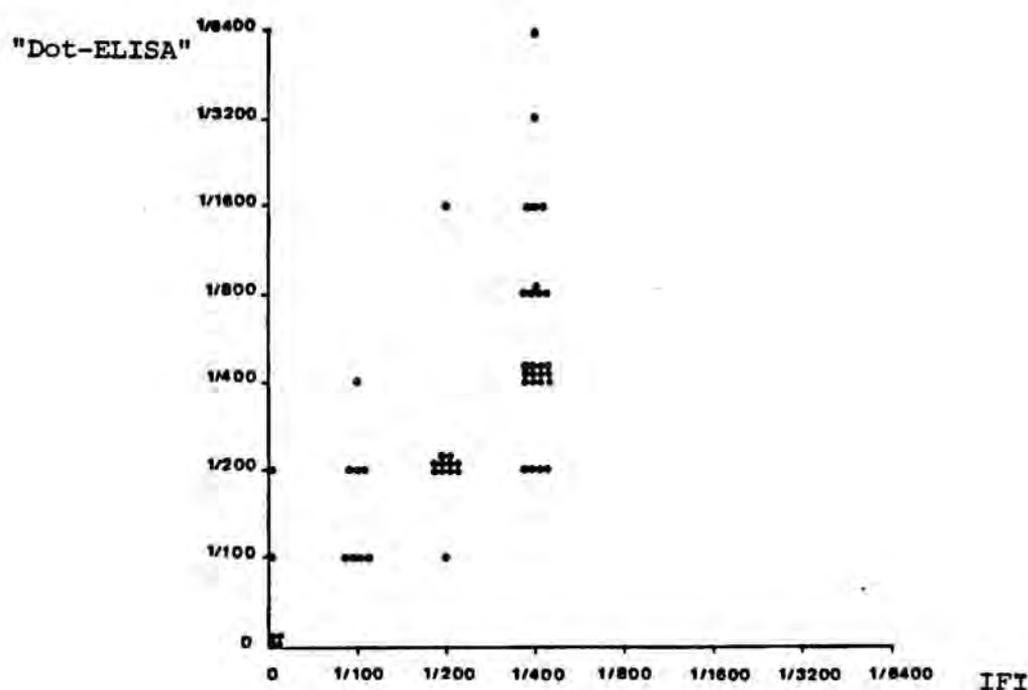


Fig. 18. Evolución serológica en el período de 6 meses.

La mayor parte de los animales han mantenido su titulación inicial, observándose en un 10-20% de los casos incrementos significativos, que en algunos casos han superado el umbral diagnóstico.

En el grupo con serología inicial 1/400, un elevado número de animales ha sufrido incrementos significativos (19%), manifestándose con mayor claridad la tendencia de los títulos a aumentar al desglosar los resultados (40%) (Tabla 17).

<u>1<sup>ra</sup> Determinación</u>		<u>Control Subsiguiente</u>	
<u>Título</u>	<u>N°</u>	<u>Título</u>	<u>N°</u>
1/400	26	1/200	4/26
		1/400	12/26
		1/800	5/26
		≥ 1/1600	5/26

Tabla 17. Evolución serológica de los animales con título inicial 1/400 durante el período de control.

### B. Estudio clínico

Entre los 52 animales con títulos serológicos bajos destaca un grupo de 6 animales (12%) que presentaban al primer análisis sintomatología compatible con una leishmaniosis, junto a un grupo de 14 animales (27%) oligosintomáticos y un tercer grupo, más importante, de 32 animales (62%) asintomáticos.

La evolución clínica de estos animales (Tabla 18) no coincide estrictamente con su evolución serológica indicada en la Tabla 16, pag. 146.

Síntomatología inicial	Evolución clínica		
	0	+	++
Asintomáticos (0)	21/32	9/32	2/32
Oligosintomáticos (+)	0/14	11/14	3/14
Sintomáticos (++)	0/6	2/6	4/6

Tabla 18. Evolución clínica de los animales con títulos serológicos bajos en la primera determinación, durante el período de control.

#### IV.2.7. DISTRIBUCION DE LA LEISHMANIOSIS EN FUNCION DE LA ESTRUCTURA DE LA POBLACION CANINA.

Las características individuales de los animales pueden influir en la capacidad de adquirir la leishmaniosis. Han sido valoradas características distintas tales como la edad, sexo, tipo de pelo, peso, tamaño y actitud. La raza no ha sido considerada ya que la mayor parte de la población estudiada era mestiza.

La población canina presentada anteriormente (Tabla 9, pag.86), abarca un conjunto de animales estudiados durante varios años, muchos de los cuales se han ido incorporando en distintos tiempos. Para evitar distorsiones en el análisis se ha escogido la población canina estudiada durante los años 1988-1989-1990, considerando los resultados serológicos obtenidos en la primera determinación, independientemente de si el animal presentaba seroconversión posterior. Se han

considerado animales afectados de leishmaniosis aquellos con serologías iguales o superiores al título diagnóstico 1/800 y/o con cultivo positivo.

#### IV.2.7.1. Influencia de la edad

Los animales estudiados se han distribuido según sus edades en siete categorías como se indica en la Tabla 19.

Edad (años)	n°/N°	P(%)	
1	10/190	5.3	
2	5/135	3.7	
3	16/115	13.9	$x^2 = 21.6$
4	10/121	8.3	g.l.= 6
5	15/86	17.4	p < 0.05
6	10/62	16.1	
≥ 7	22/197	11.2	

Tabla 19. Prevalencia de la enfermedad según la edad del animal.

n°: número de animales afectados de leishmaniosis;

N°: número de animales estudiados; P: Prevalencia.

El tratamiento estadístico muestra una relación significativa entre la edad y el padecimiento de la enfermedad, que se traduce en el aumento de la prevalencia con la edad, como se observa en el histograma según edades agrupadas (Fig. 19).

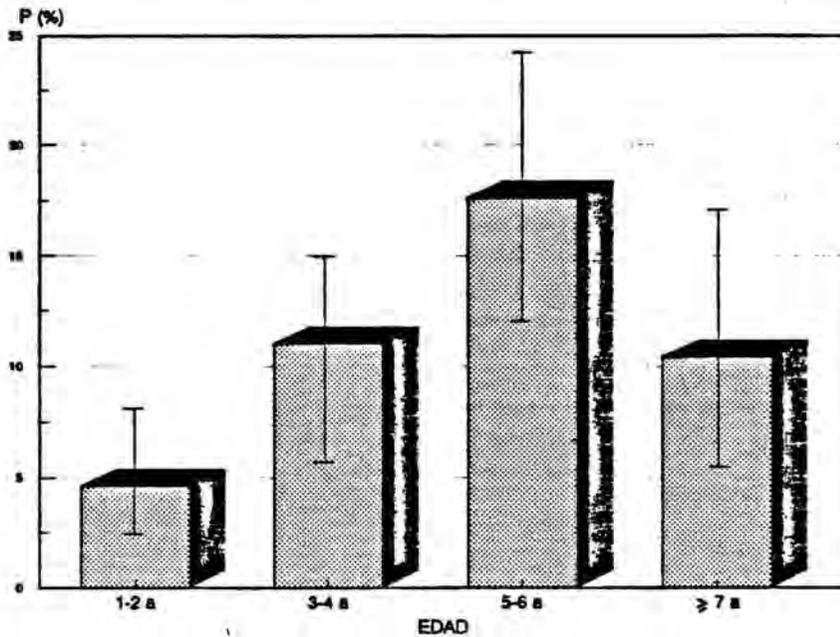


Fig. 19. Prevalencia de la leishmaniosis canina según grupos de edad.

#### IV.2.7.2. Influencia del sexo.

Los dos sexos han estado representados aproximadamente en las mismas proporciones, ya que los perros analizados se han distribuido en 432 machos y 501 hembras, en un total de 933 animales.

La prevalencia ha sido mayor en el grupo de los machos (52/432), con un 12%, que en el grupo de las hembras (36/501), con un 7.2% (Fig. 20). La dos reparticiones son estadísticamente diferentes con un grado de significación  $p < 0.05$   $\chi^2 = 6.4$

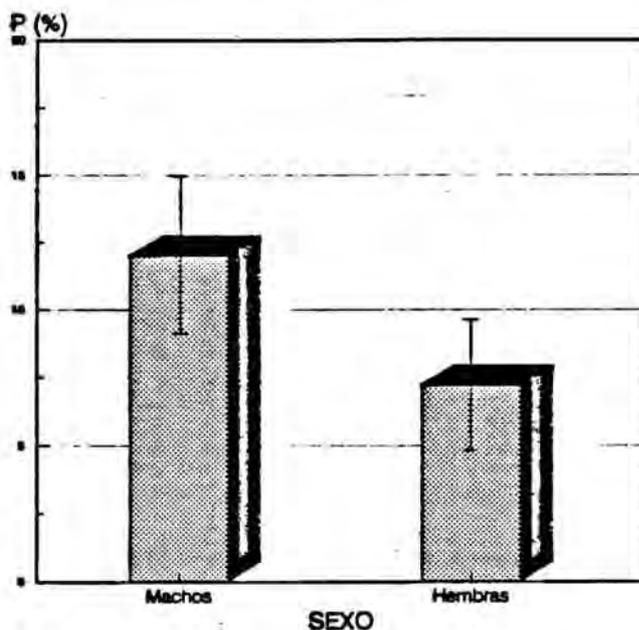


Fig. 20. Prevalencia de la leishmaniasis canina según el sexo.

Sin embargo, al considerar el sexo de los perros según su edad, se observa que la diferencia respecto al sexo entre los perros jóvenes no existe, siendo la diferencia tan solo significativa en el grupo de los adultos, donde podrían influir otros factores, (Tabla 20, Fig. 21), entre los que cabe considerar la gestación en las hembras que podría desencadenar la evolución aguda de la enfermedad.

SEXO	E D A D							
	1-2 años		3-4 años		5-6 años		≥ 7 años	
	n°/N°	%	n°/N°	%	n°/N°	%	n°/N°	%
Macho	9/155	5.8	13/113	11.5	16/65	24.6	14/94	14.9
Hembra	6/170	3.5	13/123	10.6	9/83	10.8	8/118	6.8
	$\chi^2 = 0.9$		$\chi^2 = 0.1$		$\chi^2 = 4.9$		$\chi^2 = 3.7$	
	p > 0.05		p > 0.05		p < 0.05		p > 0.05	

Tabla 20. Influencia del sexo según los grupos de edad.

n°: número de animales afectados de leishmaniasis

N°: número de animales controlados

Aceptando un riesgo del 5% tan solo se cumple la hipótesis de dependencia en el grupo de animales adultos de 5-6 años, hallándose en el límite el grupo de los animales viejos  $\geq 7$  años.

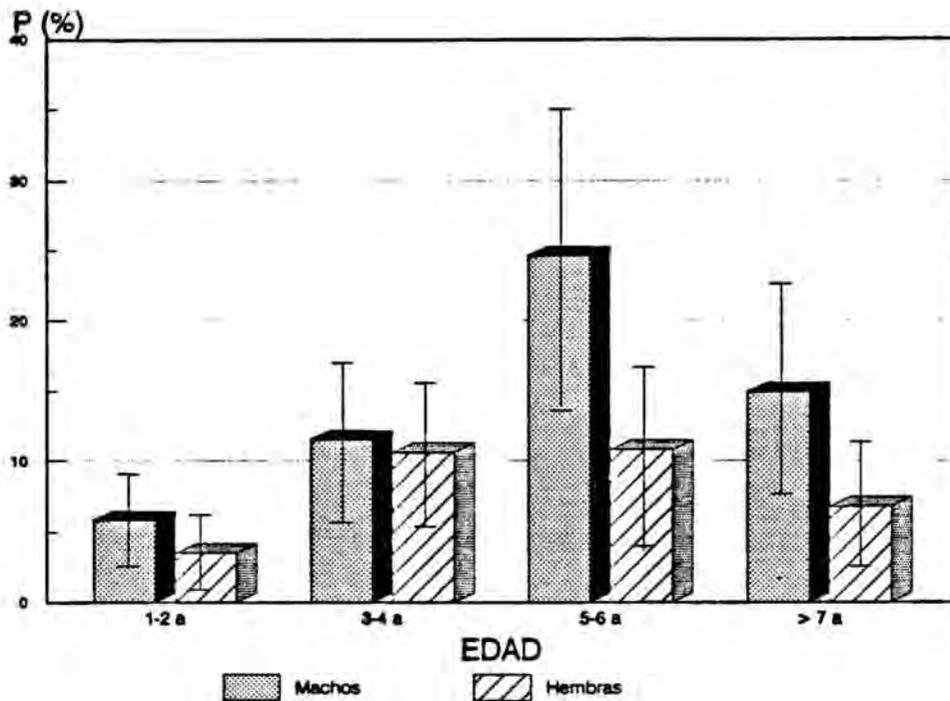


Fig.21. Prevalencia de la leishmaniosis según el sexo en las distintas edades.

#### IV.2.7.3 Influencia de la longitud del pelo

Al agrupar los perros según la longitud de su pelaje, se han considerado tres categorías: perros con pelo corto (406), perros con pelo medio (140) y perros con pelo largo (378). Las prevalencias halladas se indican en la Tabla 21.

Pelo	n°/N°	P(%)
corto	42/406	10.3
medio	13/140	9.3
largo	34/378	9.0

Tabla 21. Prevalencia de la enfermedad según la longitud del pelo.

n°: número de animales afectos de leishmaniosis;

N°: número de animales estudiados; P: prevalencia.

No se detecta diferencia estadísticamente significativa según sea la longitud del pelo ( $x^2=0.43$ , g.l.= 2,  $p > 0.05$ ).

#### I.2.7.4. Influencia del peso y tamaño

Se ha distribuido la población canina estudiada según su peso aproximado, que es una medida indirecta de su tamaño, en tres grupos: < 12 Kg, (243 animales), entre 12-35Kg (558 animales) y  $\geq$  35 Kg (123 animales), como se muestra en la Tabla 22, donde se indican las prevalencias detectadas.

La diferencia estadísticamente no es significativa ( $x^2=5.2$ , g.l.= 2,  $p > 0.05$ ), aunque se observa una mayor tendencia a contraer la enfermedad al aumentar el peso y tamaño del animal.

Peso	n°/N°	P(%)
< 12 Kg	19/243	7.8
≥ 12 Kg < 35 Kg	52/558	9.3
≥ 35 Kg	18/123	14.6

Tabla 22. Prevalencia de la enfermedad según el peso del animal.

n°: número de animales afectados de leishmaniosis;  
N°: número de animales estudiados; P: prevalencia.

#### IV.2.7.5. Influencia de la actividad

La población canina estudiada es una población rural en su mayor parte, que habita en el interior o muy cerca de las casas, pero con actividad diurna en el exterior, por los campos y libremente dentro de los municipios.

Por ello sólo se han tenido en cuenta dos grupos, los perros de compañía y vigilancia (574) y los perros dedicados a la caza y al pastoreo (358). Los dos grupos están compuestos por animales que pasan parte del día al exterior, siendo la mayor diferencia debida al desplazamiento más importante hacia otras zonas de los perros de caza y pastoreo. En la Tabla 23 se indica la prevalencia observada.

La diferencia no es estadísticamente significativa ( $x^2=0.78$ ,  $p > 0.05$ ) entre los dos grupos, como era de esperar ante la poca heterogeneidad de la muestra.

Actividad	n°/N°	P (%)
Compañía y vigilancia	59/574	10.3
Caza y pastoreo	30/358	8.4

Tabla 23. Prevalencia de la enfermedad según la actividad del animal.

n°: número de animales afectos de leishmaniosis;

N°: número de animales estudiados; P: prevalencia.

#### IV.2.8. DISTRIBUCION ESPACIAL DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

##### IV.2.8.1. Distribución por localidades

La población canina estudiada ha procedido de 26 localidades (Tabla 4, pag.53) de la Comarca del Priorat (Fig. 6, pag.44). En algunas de ellas el estudio se repitió en años sucesivos.

Los resultados serológicos obtenidos por población y año, se indican en la Tabla 24. Cuando por circunstancias diversas, a un animal se le efectuó más de una determinación serológica en un mismo año únicamente se ha tenido en cuenta una sola determinación: aquella que dió un título mayor.

Localidad	Año	"Dot-ELISA": neg							
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	≥1/6400	
	IFI	: neg							
		1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	≥1/640	
1. Bellmunt	1989	29	12	3	2	2	1	1	3
2. Cabassers	1989	21	6	1	-	2	-	-	-
	1990	14	7	3	1	2	-	-	-
3. Capçanes	1988	11	4	2	-	-	-	-	1
	1989	-	1	2	-	-	-	-	1
4. Ciurana	1989	9	-	-	-	-	-	-	-
5. Cornudella	1985	65 <sup>a</sup>	-	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	-	-	-
	1989	26	7	3	2	-	1	-	2
	1990	30	6	3	4	2	-	1	1
6. El Molar	1989	13	11	11	3	1	1	2	1
	1990	13	5	13	2	1	-	-	-
7. Els Guiamets	1989	12	6	5	3	2	5	-	-
8. Falset	1988	43	27	1	3	2	3	2	-
	1989	9	18	6	3	4	-	2	1
	1990	38	20	8	4	3	-	-	-
9. Gratallops	1988	21	1	2	3	-	-	-	1
	1989	8	6	3	1	-	-	-	-
10. La Bisbal	1989	10	8	2	-	-	-	-	-
11. La Figuera	1989	11	6	2	-	-	1	-	-
12. La Morera	1988	10	3	-	-	-	-	-	-
	1990	6	2	-	-	-	1	-	-
13. La Torre de F.	1989	1	2	1	1	-	-	-	-
14. Lloà	1989	1	4	3	3	3	1	-	-
15. Marçà	1989	17	4	-	-	2	1	2	-
16. Margalef	1988	14	1	-	-	-	-	-	-
	1990	11	2	6	-	-	-	-	-
17. Masroig	1989	24	8	6	3	1	-	-	-
18. Poboleda	1986	21 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
	1988	16	3	-	2	2	1	1	3
	1989	23	5	-	2	2	-	-	4

..../....

..../....

Localidad	Año	"Dot-ELISA": neg	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	≥1/6400
		IFI : neg	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	≥1/640
19. Porrera	1988	30	6	3	2	1	1	-	2
	1989	3	6	1	-	1	-	-	-
	1990	23	9	12	3	1	-	1	1
20. Pradell T.	1989	14	10	3	-	-	1	-	2
21. Scala Dei	1988	7	-	2	-	-	-	2	-
	1989	-	-	-	-	-	-	1	-
	1990	4	-	1	-	-	-	-	-
22. Torroja	1987	7	3	4	13	4	1	-	-
	1988	8	6	8	3	5	1	-	2
	1989	8	4	11	2	4	3	-	-
	1990	5	7	4	1	3	1	-	-
23. Ulldemolins	1989	15	18	5	-	-	-	-	-
24. Vilella Alta	1986	8*	3*	4*	1*	3*	-	1*	-
	1989	13	7	2	-	1	-	-	-
25. Vilella Baixa	1986	3*	7*	5*	-	1*	-	-	-
	1989	7	7	5	5	2	-	-	-
	1990	3	2	6	5	5	1	-	-
26. La Venta	1989	7	7	6	2	1	2	1	2
	1990	3	2	2	-	-	1	2	1
Totales		598	279	161	78	59	28	18	28
		97*	16*	23*	13*	6*	2*	6*	2*

Tabla 24. Resultados serológicos "Dot-ELISA" e IFI por localidad y año.

\*: Resultados IFI.

#### A. Estudios de prevalencia

Los resultados anteriores se han resumido por población y año según sus prevalencias (P) y la media geométrica de la inversa de sus títulos, TGM. Para comparar mejor los resultados entre sí, se ha calculado cuando ha sido posible la media de la prevalencia (Pm) y de la TGM (TGMM) de los últimos años (1988, 1989 y 1990) (Tabla 25, Figs. 22 y 23).

Al considerar la prevalencia media de las distintas localidades estudiadas aparecen resultados variables que oscilan entre valores negativos (Pm=0) en pueblos como La Bisbal, Margalef y Ciurana, hasta valores máximos (alrededor del 25%) en localidades como Lloà, Torroja y La Venta. Estadísticamente la diferencia es significativa ( $\chi^2 = 78.97$ ,  $p < 0.001$  g.l.= 25).

La TGM (Anexo 6) aparece como una buena medida de la actividad enzoótica de la enfermedad en el espacio, ya que tiene en cuenta el total de los resultados inmunológicos sin necesidad de interpretar los resultados. Por ello puede ser un buen índice para comparar los resultados serológicos obtenidos en diferentes zonas, aunque no expresa en ningún momento la prevalencia de la enfermedad. Por otro lado, presenta el inconveniente de sobreestimar los títulos serológicos bajos, ya que su cálculo está muy influenciado por el número de análisis con títulos bajos o nulos. Para su cálculo no es posible utilizar valores negativos por lo que se ha adoptado considerar que todos los sueros serían positivos si no estuvieran diluïdos (dilución 1/1) (Lanotte, 1975).

Localidad	1985-86-87		1988		1989		1990		1988-89-90	
	P	TGM	P	TGM	P	TGM	P	TGM	P <sub>m</sub>	TGM <sub>m</sub>
1 Bellmunt					13.2	13.5			13.2	13.5
2 Cabassers					6.7	4.7	7.4	12.2	7.0	7.4
3 Capçanes			5.6	8.1					5.6	8.1
4 Ciurana					0	1			0	1
5 Cornudella	1.5*	1.2*			7.3	6.4	8.5	8.0	7.9	7.2
6 El Molar					11.6	47.2	2.9	25.8	7.7	36.2
7 Els Guianets					21.2	40.6			21.2	40.6
8 Falset			8.6	11.7	(16.3	72.5)	4.1	11.5	6.4	11.6
9 Gratallops			3.6	4.5	0	15.6			1.8	7.3
10 La Bisbal					0	10.7			0	10.7
11 La Figuera					5	9.8			5	9.8
12 La Morera			0	1.7			11.1	6.3	4.6	4.0
13 La Torre de F.					0	60.3			0	60.3
14 Lloà					26.7	202.6			26.7	202.6
15 Marçà					19.2	8.4			19.2	8.4
16 Margalef			0	1.4			0	8.6	0	3.8
17 Masroig					2.4	9.2			2.4	9.2
18 Poboleda	16.7*	11.4*	25	17.9	16.7	10.1			18.6	13.0
19 Porrera			8.9	6.9	9.1	36.6	6	18.7	7.6	13.1
20 Pradell					10	18.1			10	18.1
21 Scala Dei			18.2	11.3			0	2.9	9.1	7.4
22 Torroja	15.6	98.6	24.2	84.0	21.9	73.4	19.1	62.4	22.1	74.3
23 Ulldemolins					0	17.8			0	17.8
24 Vilella Alta	5*	31.6*			4.3	8.6			4.3	8.6
25 Vilella Baixa	6.2	9.2			7.7	50.6	27.3	160.1	16.7	85.8
26 La Venta					21.4	80.7	36.4	113.4	28.9	88.9

Tabla 25. Resumen de los resultados serológicos, expresados en Prevalencia y TGM, por localidad y año.

\* Resultados obtenidos mediante la técnica de IFI.

( ) los resultados englobados en un paréntesis, no han sido tomados en cuenta al calcular la media de los tres últimos años, debido a sesgos en el sistema de muestreo.

P: Prevalencia; TGM: media geométrica de la inversa de los títulos serológicos; P<sub>m</sub>: prevalencia media.

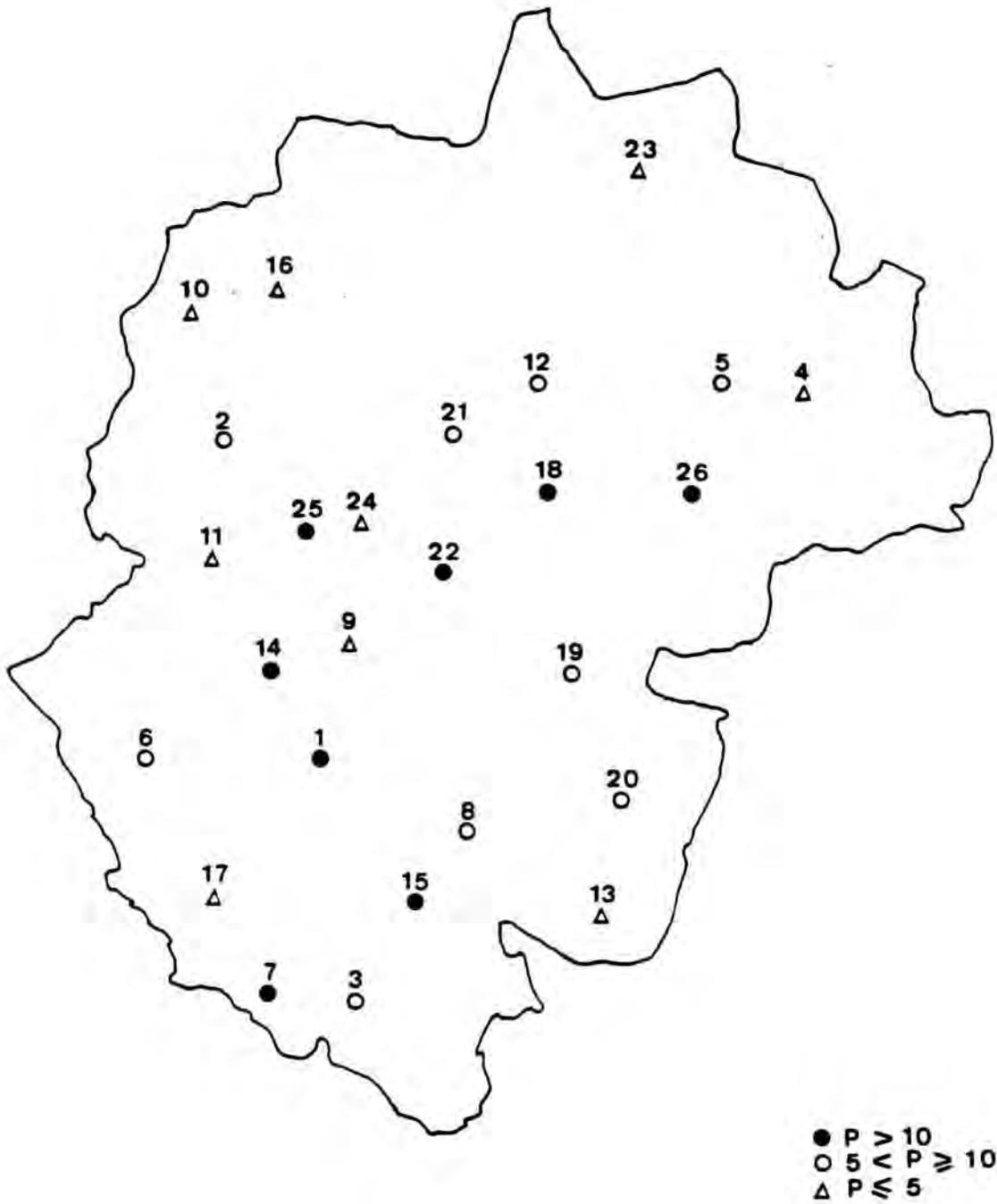


Fig. 22. Distribución de la leishmaniosis canina en la comarca según los valores de prevalencia hallados en las localidades estudiadas.

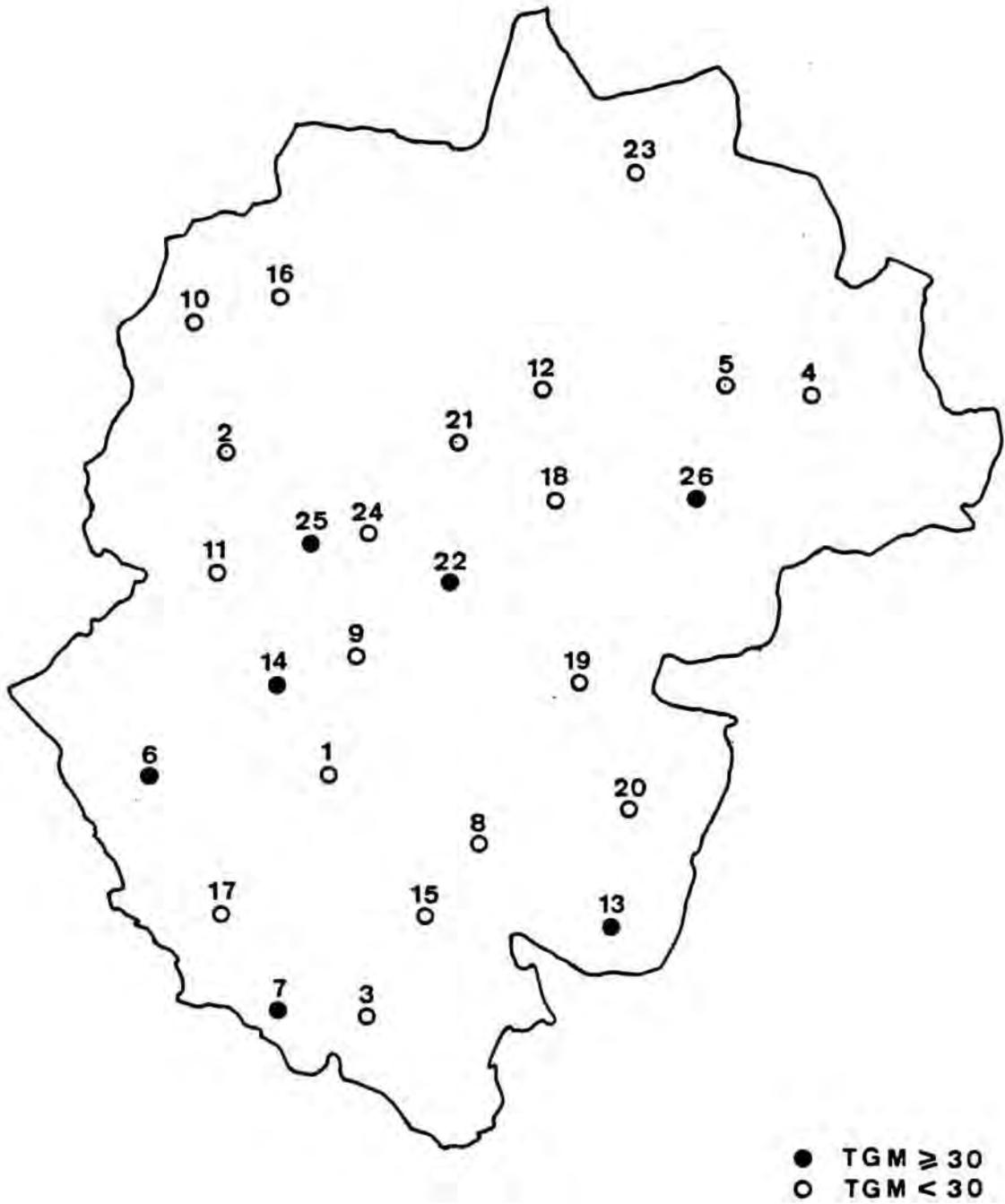


Fig. 23. Distribución de la leishmaniosis canina en la comarca según los valores de TGM hallados en las localidades estudiadas.

B. Estudios de incidencia

El cálculo de la incidencia en cada una de las poblaciones se ha realizado tal como se indica en el apartado IV.2.5., pag. para el estudio de la incidencia global de la leishmaniosis en la comarca.

En ocasiones ha sido difícil conocer la aparición de nuevos casos en un año (incidencia anual), pero en cambio se conocía para períodos de tiempo superiores, que han sido igualmente considerados después de realizar la transformación correspondiente.

En la Tabla 26 se muestran las incidencias anuales calculadas en diversas poblaciones, no siendo posible el cálculo en las restantes localidades ya fuera porque el número de animales controlados era poco significativo o porque no se habían realizado controles sucesivos.

N° Localidad	n° animales controlados	Incidencia anual (%)
2 Cabassers	25	4
5 Cornudella	58	2.8
6 El Molar	30	3.3
8 Falset	50	3.7
9 Gratallops	7	0
12 La Morera	9	5.5
16 Margalef	14	0
18 Poboleda	28	12.5
19 Porrera	40	7.5
22 Torroja	67	13.4
25 Vilella Baixa	39	9.3

Tabla 26. Incidencia de la leishmaniosis en diversas localidades.

N°: número de localidad.

#### IV.2.8.2. Distribución espacial por áreas.

Para mejor valorar la repartición en el espacio de la leishmaniosis, sobre un número de muestras mayor y por tanto más representativo, la comarca el Priorat se ha dividido en seis áreas de 10x10 km.

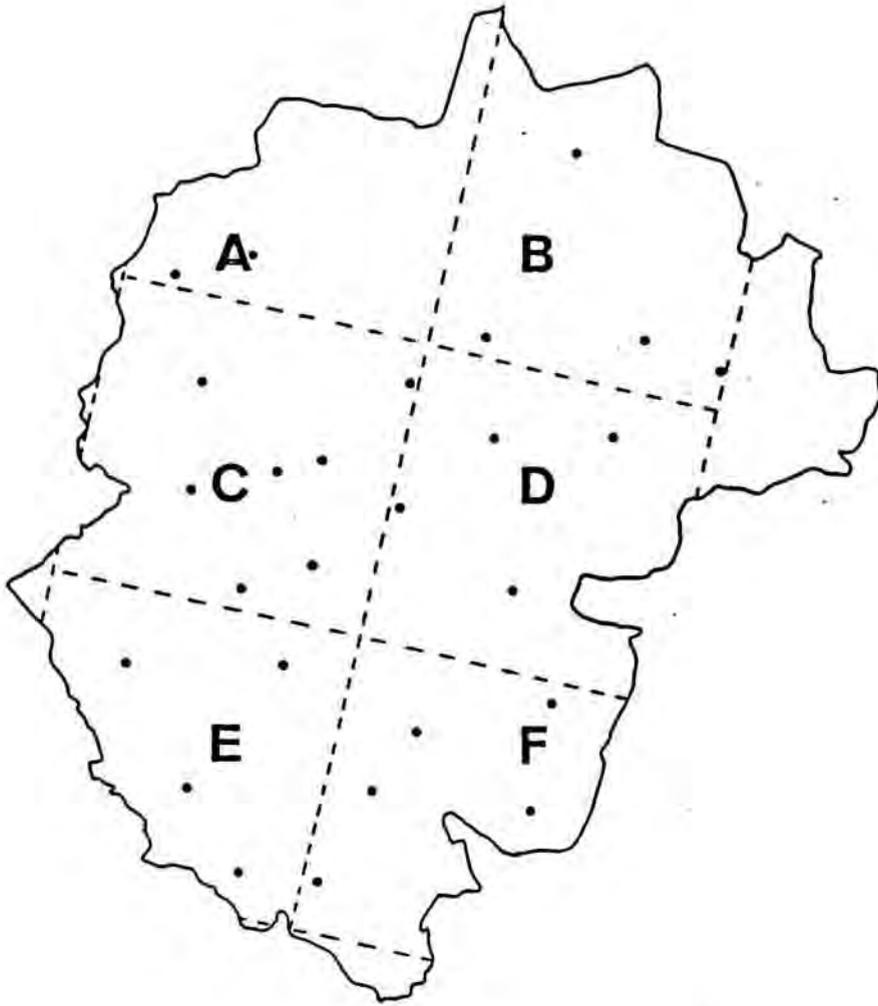
En la Tabla 27 se indica la prevalencia media (Pm), TGMm y la incidencia anual media (Im) en las diversas áreas, calculadas a partir de los resultados obtenidos en los tres últimos años, 1988-1989-1990. En ella no se ha tenido en cuenta los resultados de la población N° 8 del 1989 por el sesgo introducido en el muestreo; tampoco se ha contabilizado los resultados del año 1989 de la población N° 3 y N° 21 por el escaso número de muestras estudiadas.

Area	Pm %	TGMm	Im %	N° muestras	Localidades (N°)
A	0	5.6	-	54	10,16
B	5.1	7.4	3.7	157	4,5,12,23
C	9.3	16.1	6.2	225	2,9,11,14,21,24,25
D	16.9	28.0	9.2	295	18,19,22,26
E	10.2	21.6	-	205	1,6,7,17
F	8.2	11.9	-	233	3,8,13,15,20

Tabla 27. Distribución de la leishmaniosis canina en la comarca por áreas (100 Km<sup>2</sup>).

Pm: prevalencia media; TGM: media geométrica de la inversa de los títulos; Im: incidencia media.

$$x^2 = 27.5 \quad g.l. = 5 \quad p < 0.05$$



**A** Pm: 0  
TGMm: 5.6

**B** Pm: 5.1  
TGMm: 7.4

**C** Pm: 9.3  
TGMm: 16.1

**D** Pm: 16.9  
TGMm: 28.0

**E** Pm: 10.2  
TGMm: 21.6

**F** Pm: 8.2  
TGMm: 11.9

Fig. 24. Leishmaniosis canina en la comarca según los valores de prevalencia y TGM detectados en las áreas descritas (100 Km<sup>2</sup>).

Destaca el área A donde no se ha encontrado ningún animal afectado de leishmaniosis, como expresa la prevalencia nula hallada  $P_m = 0$ . Sin embargo, la TGMm detectada, aunque baja, nos indica que existen animales con títulos bajos de anticuerpos específicos anti-Leishmania, sin alcanzar el umbral diagnóstico. El área B presenta  $P_m$  y TGMm intermedia, y las áreas restantes C, D, E y F, presentan todas ellas  $P_m$  y TGMm elevadas. (Fig. 24).

#### IV.2.8.3. Distribución altitudinal

Agrupadas las localidades según altitudes (Tabla 28) se observa que la mayor prevalencia de la leishmaniosis se detecta entre 200-500 metros, siendo baja o nula a altitudes mayores, aunque presenta valores de TGMm indicativos de la presencia de la afección.

Altitud	$P_m$	TGMm	n° muestras	Localidades incluidas (N°)
200-300	11.89	28.77	286	1,3,6,7,14,17,25
301-400	9.82	12.95	621	2,8,9,10,13,15,16,18,19,22,24
401-500	17.65	31.71	85	20,21,26
501-600	7.41	7.63	108	5,11
601-700	0	17.78	38	23
701-800	3.23	2.67	31	4,12

Tabla 28. Distribución de la leishmaniosis canina en la según las distintas altitudes.

$P_m$ : prevalencia media; TGM: media geométrica de la inversa de los títulos.

En las Figs. 25 y 26 se presenta gráficamente la relación existente entre la leishmaniosis canina expresada en prevalencia y en TGM y los distintos niveles altitudinales en la comarca.

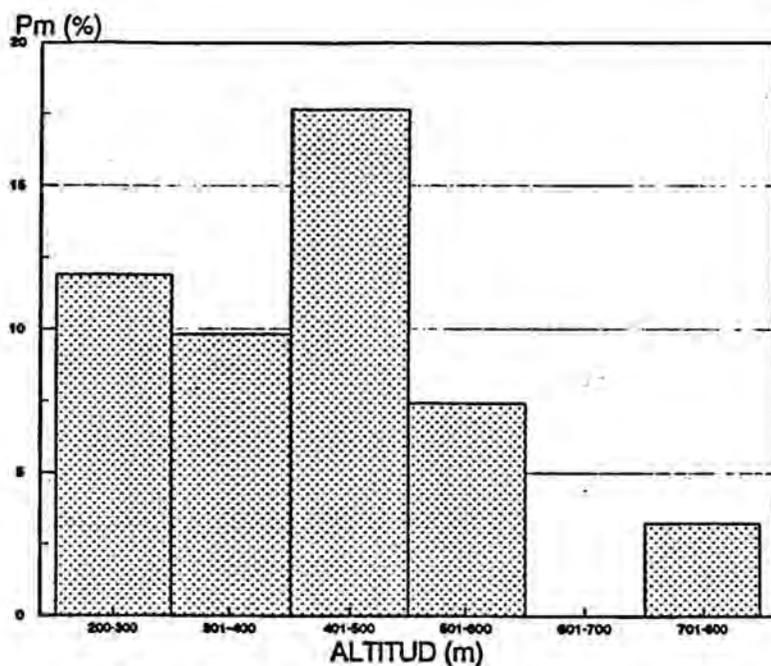


Fig. 25. Leishmaniosis canina expresada en prevalencia según la altitud.

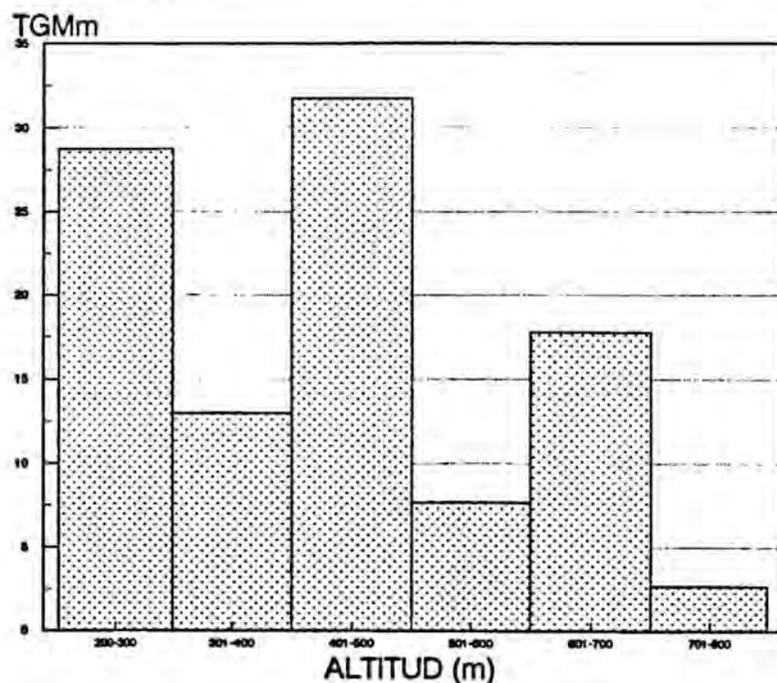


Fig. 26. Leishmaniosis canina expresada en TGM según la altitud.

#### IV.2.8.4. Distribución global.

A la vista de los resultados hallados según las áreas teóricas descritas (Tabla 27, pag.164), los estratos según altitudes y teniendo en cuenta, asimismo, los resultados de las localidades que las conforman (Tabla 25, pag.160) y su distribución geográfica en la comarca (Fig. 6, pag 41), podrían considerarse dos grandes bloques:

a) Zona de alta endemia que correspondería a las áreas anteriormente descritas C,D,E y F, que constituyen el Priorat Central y el Bajo Priorat .

b) Zona de baja endemia constituida por las áreas A y B (Alto Priorat ), separadas del resto por el macizo del Montsant que actuaría de barrera natural.

#### IV.2.9. IDENTIFICACION DEL PARASITO.

Las cepas de Leishmania aisladas, en la población canina de la comarca del Priorat , se han caracterizado por sus perfiles enzimáticos. El estudio isoenzimático ha permitido individualizar dos zimodemas MON-1 y MON-77, pertenecientes al complejo Leishmania infantum (Moreno, 1989) que difieren tan solo en un isoenzima G6PD como se observa en la Tabla 29.

---

Zimodema	MDH	G6PD	NP	GOT	FH	MPI	GPI	ME	PGD	GLUD	PGM
MON-1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MON-77	100	102*	100	100	100	100	100	100	100	100	100

---

Tabla 29. Perfiles enzimáticos de los zimodemas identificados en el perro.

\* Electromorfo compuesto.

En la Tabla 30 se indican las cepas aisladas siguiendo la nomenclatura recomendada por la O.M.S. (IV.1.3.2., pag.82) y los zimodemas caracterizados. Se indica, además, el órgano del cual se ha aislado la cepa, el número de identificación del animal y la localidad de procedencia.

Entre las 27 cepas identificadas, la mayoría (20 cepas corresponden al zimodema MON-1, que es el zimodema habitualmente hallado en las formas viscerales, humanas y caninas, de la región mediterránea occidental. Aparecen 7 cepas con zimodema distinto, identificadas como pertenecientes al zimodema MON-77 (Moreno, 1989) y en la actualidad no aislado de ningún otro foco.

Destaca el caso del animal n° 436 de la población de la Torroja, que presentó los dos zimodemas, MON-1 y MON-77, en condiciones simpátricas, aislados de ganglio poplíteo y de una lesión cutánea respectivamente.

Nomenclatura cepa	Zimodema	Organo	N°A	N°L
MCAN/ES/86/ LEM-937	MON-1	g	835	18
MCAN/ES/86/ LEM-938	MON-1	g	836	18
MCAN/ES/86/ LEM-939	MON-1	g	845	18
MCAN/ES/86/ LEM-935	MON-77	g	809	18
MCAN/ES/86/ LEM-931	MON-1	g	804	18
MCAN/ES/86/ LEM-936	MON-1	g	829	18
MCAN/ES/87/ LEM-1151	MON-1	g	447	22
MCAN/ES/87/ LEM-1165	MON-1	g	444	22
MCAN/ES/87/ LEM-1152	MON-1	g	436	22
MCAN/ES/87/ LEM-1149	MON-77	l	436	22
MCAN/ES/87/ LEM-1148	MON-77	g	429	22
MCAN/ES/87/ LEM-1147	MON-1	g	423	22
MCAN/ES/88/ BCN-23	MON-1	g	448	22
			...../.....	

...../.....

Nomenclatura cepa	Zimodema	Organo	N°A	N°L
MCAN/ES/88/ BCN-26	MON-1	g	45	19
MCAN/ES/88/ BCN-27	MON-1	g	829	18
MCAN/ES/89/ BCN-31	MON-1	g	461	22
MCAN/ES/89/ BCN-35	MON-77	g	429	22
MCAN/ES/89/ BCN-36	MON-1	g	612	1
MCAN/ES/89/ BCN-37	MON-1	g	307	21
MCAN/ES/89/ BCN-38	MON-1	g	801	18
MCAN/ES/89/ BCN-39	MON-77	l	429	22
MCAN/ES/89/ BCN-40	MON-77	g	452	22
MCAN/ES/89/ BCN-43	MON-1	g	977	8
MCAN/ES/89/ BCN-44	MON-1	g	739	15
MCAN/ES/89/ BCN-45	MON-77	g	101	6
MCAN/ES/89/ BCN-47	MON-1	g	968	8
MCAN/ES/89/ BCN-48	MON-1	g	104	6

Tabla 30. Caracterización isoenzimática de las cepas aisladas y su procedencia.

M.O: médula ósea; g: ganglio poplíteo; l: lesión cutánea. N°A: número de identificación del animal. N°L: número de la localidad a la que pertenece el animal.

DISCUSSION

### IV.3. DISCUSION

El estudio de la enzootía canina constituye una etapa esencial para el conocimiento de la estructura y dinámica de un foco leishmaniósico. Los estudios serológicos de cribado y control han permitido detectar la morbilidad y seguir la evolución de los animales, para conocer el estado inmunológico frente a *Leishmania* de la población canina y valorar su significado.

#### IV.3.1. UTILIDAD E IDONEIDAD DE LA TECNICA "Dot-ELISA"

Son diversas las técnicas serológicas que han sido descritas para el diagnóstico de la leishmaniosis. Entre ellas, cabe destacar, la técnica clásica de la IFI (Lanotte, 1975; Badaró y col., 1983), las técnicas inmunoenzimáticas "ELISA" y "Dot-ELISA" (Hommel y col., 1978; Ho y col., 1984; Pappas y col., 1983b; El Amin El Roufaie Mohammed y col., 1985; Choudhry y col., 1990; Scott y col., 1991), técnicas de aglutinación directa (El Harith y col., 1986; El Harith y col., 1989; Franck y col., 1986), técnicas de látex (Mayrink y col., 1972; Dereure, 1986), técnicas de hemoaglutinación indirecta o HAI (Ghose y col., 1980; Mancianti y Meciani, 1988b; El Amin El Roufaie Mohammed y col., 1986) y las técnicas de precipitación en gel, entre las que sobresale la contrainmunolectroforesis o CIEF (Mansueto y col., 1979; Mancianti y Meciani, 1988b; Korte de. y col., 1990).

En el presente estudio se ha utilizado, fundamentalmente, la técnica "Dot-ELISA", descrita y estandarizada por Pappas y col. (1983b, 1984b) para el diagnóstico de la leishmaniosis visceral del Viejo Mundo.

El "Dot-ELISA" ha sido escogido por ser una técnica fácilmente adaptable a estudios sobre el terreno, ya que admite la conservación de los reactivos a 4<sup>0</sup>C y la lectura visual de los

resultados. Además presenta como ventajas el ser una técnica rápida (aproximadamente 2h.) y requerir muy pequeñas cantidades de antígeno. La técnica ha sido modificada introduciendo como conjugado la Proteína-A unida al enzima peroxidasa, que permite el estudio del perro y de otros animales (roedores, zorros, ovejas, cabras, etc.) utilizando un mismo conjugado, y que consigue trabajar a diluciones muy elevadas de suero (Reed y col. 1990), con lo que desaparecen muchos problemas de inspecificidades propias de las sueros poco diluidos.

Aunque el "Dot-ELISA"-Proteína A-PO había sido estandarizado con anterioridad por nuestro equipo (Serra y col., 1987; Fisa y col., 1987; Portús y col., 1987b), en el presente trabajo se ha revisado la determinación del título diagnóstico. Ello se ha realizado comparando los resultados del "Dot-ELISA" con los obtenidos mediante la IFI (realizada en paralelo) y con los resultados parasitológicos, y además aplicando el método global de la distribución bimodal que sufren los títulos serológicos en zona endémica, indicado por varios autores (Kagan y col., 1969; Lanotte y col., 1977; Abranches y col., 1983b).

De los resultados (IV.2.2.1., pag.131) se desprende la adopción del título 1/800 como el título diagnóstico que expresa una leishmaniosis evolutiva, con una sensibilidad de 90.3% y una especificidad comparable a la de la técnica de IFI. Sin embargo, debe indicarse la importancia de los títulos bajos, principalmente 1/400 (12% positividad en el examen etiológico), que pueden ser indicativos de leishmaniosis incipientes, crípticas o recesivas. La aparición de muchos animales con títulos bajos, que no superan el umbral diagnóstico, no ha permitido discernir el título diagnóstico por el método global de repartición bimodal de los títulos indicado (Kagan y col., 1969).

#### IV.3.2. RELACION SEROLOGIA-PATOLOGIA

Al observar la relación entre los resultados serológicos hallados y el estado clínico que presentaban los animales (Tabla 12, pag. 137) aparece una clara divergencia entre los animales con títulos  $\geq 1/800$ , título diagnóstico, y los animales que presentaban títulos inferiores.

- Los animales seropositivos con títulos  $\geq 1/800$ , considerados animales con una leishmaniosis evolutiva, han presentado una sintomatología variada. Tan solo un 35% de los animales han mostrado sintomatología clara, estado sintomático, frente a un 65% que se han definido como asintomáticos (30%) u oligosintomáticos (35%). Nuestros datos corroboran, una vez más, la frecuencia de formas asintomáticas en el perro, que han sido repetidas veces citadas en focos del Mediterráneo, con porcentajes que oscilan entre un 10%-65% (Lanotte y col., 1979; Gradoni y col., 1980; Pozio y col., 1981a; Mansueto y col., 1982; Jambou y col., 1986; Mancianti y col., 1986; Mancianti y col., 1988a; Marty y col., 1986; Martínez Cruz, 1989; Brandonisio y col., 1990).

No se ha hallado una relación manifiesta entre los títulos serológicos hallados y la sintomatología que presentaba el animal. Tan solo se ha detectado una ligera tendencia a aumentar los títulos, expresada por un ligero aumento de la inversa de su media geométrica (TGM), cuando empeoró la clínica, coincidiendo en ello con Lanotte y col. (1979) y Mancianti y col. (1988a), quienes citan la independencia entre los títulos serológicos y los síntomas clínicos, lo cual difiere de los resultados presentados por Pozio y col. (1981a), quienes consideran que al aumentar el título aumenta la severidad de los síntomas, aunque también observan resultados dispares.

- Los animales con serologías positivas bajas, que no superan el umbral diagnóstico, o totalmente negativas, no han presentado en su mayoría sintomatología sospechosa. 79% eran asintomáticos y 16% oligosintomáticos que englobados en un solo grupo representan el 95% de los casos, frente a un 5% que han presentado sintomatología.

#### IV.3.3. RELACION CULTIVO CON SEROLOGIA Y CLINICA

Al relacionar los cultivos con la serología y la clínica (Tabla 12, pag. 137), se observa que existe una diferencia marcada en el éxito de los cultivos según la serología hallada y una escasa influencia de la sintomatología.

- En el grupo de animales con serología  $\geq 1/800$  el porcentaje de aislamientos es aproximadamente del 50% sobre las punciones ganglionares realizadas, sin observarse variaciones importantes al aumentar el título, lo que difiere de los resultados presentados por Lanotte (1975), quien observa un aumento paralelo de positividad al aumentar los títulos, y de Pozio y col. (1981a) quienes hallan un incremento de positividad en la observación microscópica.

El método carece de una buena sensibilidad. Sin embargo, estudios realizados por Lanotte (1975) indican que es posible obtener aproximadamente un 94% de éxito en el diagnóstico parasitológico si se realizan tres punciones ganglionares consecutivas. La escasa sensibilidad de la técnica puede ser debida a causas muy variadas: punciones incorrectas, medio de cultivo alterado, temperatura inadecuada, contaminaciones accidentales, baja tasa de parásitos, mal crecimiento de la cepa, etc.

- En el grupo de animales con serologías bajas no significativas, el cultivo ha sido positivo en tan solo 3 casos sobre 51 punciones ganglionares realizadas. Los tres casos aislados pertenecían a animales con título serológico 1/400, muy próximo al título diagnóstico (porcentaje de aislamientos 12%).

De los resultados parasitológicos parece desprenderse que el parásito está presente en los ganglios linfáticos, en los animales con seropositividad, independientemente de la clínica que presenten.

Los títulos serológicos bajos pueden representar leishmaniosis incipientes, en las que el parásito está presente en bajas tasas, o leishmaniosis regresivas, en las que el parásito tiende a desaparecer. Es posible también que la baja tasa de anticuerpos presentes sea el resultado de contactos con el parásito que no prosperaron (Dunan y col., 1989). No puede descartarse tampoco la posibilidad de reacciones cruzadas (Dunan y Toga, 1988), aún cuando su existencia no parece probable, al menos en proporción importante, ya que en estudios realizados utilizando la misma técnica inmunoenzimática en zona no endémica no se detectaron (Seguí, 1991).

#### IV.3.4. PREVALENCIA E INCIDENCIA

En la comarca estudiada la prevalencia de la enfermedad se sitúa en 10.2%, con un 40% de animales con serologías bajas y tan solo con un 49.8% totalmente seronegativos (IV.2.4., pag. 139).

La prevalencia hallada es comparable a los resultados encontrados en distintas zonas de España: en Zaragoza

(Castillo Hernández y col., 1985), en Granada (Reyes Magaña y col., 1988; Martínez Cruz y col., 1990), en Salamanca (Encinas Grandes y col., 1988), en Almería (Sanchís Marín y col., 1986), en Cáceres (Nieto y col., 1989) (Tabla 2, pag.31).

Comparando con otros focos del Mediterráneo, se asemeja a las halladas en Francia en los Alpes Marítimos (Marty y col., 1986; Marty y col., 1988b) y en Córcega (Rioux y col., 1972b), en Italia en Promontorio Gargano (Brandonisio y col., 1990), en Portugal en la zona de rural de Lisboa y en el Alto Duero (Abranches y col., 1983b, Abranches y col., 1990), en Argelia en Biskra (Belazzoug, 1986a), en el centro de Túnez (Ben Ismail y col., 1990), etc. Es inferior, sin embargo, a los resultados hallados en otros focos italianos (Gradoni y col., 1980, Mancianti y col., 1986; Mansueto y col., 1981b) y de Malta (Cañavate y col., 1990) y superior a la detectada en otros focos franceses (Rioux y col., 1985, Lanotte y col., 1978) e italianos (Gradoni y col., 1980).

Es importante remarcar la existencia de un elevado porcentaje (40%) de animales con baja seropositividad que no llegan al umbral diagnóstico, citado también en otros focos leishmaniósicos (Abranches y col., 1983b; Acedo Sánchez y col., 1991), máxime cuando su presencia es escasa o nula cuando se analizan animales procedentes de zona no endémica, 1-2% en Menorca (Seguí, 1991).

La incidencia anual (IV.2.5., pag.140), se ha situado alrededor del 6% (5.7%), sin observarse diferencias estadísticas entre animales jóvenes y animales adultos, lo que parece indicar que no existe una predisposición especial a contraer la enfermedad según la edad del individuo. Gradoni y col. (1988), en estudios realizados en la isla de Elba, indican una mayor incidencia en los animales adultos, remarcando la posibilidad de infecciones inaparentes en este grupo no percibidas en el examen previo, detectando una incidencia de 12.4% cuando la

prevalencia en el foco es de 22.2% y observando una disminución substancial (4.6%) cuando la prevalencia desciende a 14.2%, después de la aplicación de medidas de control (tratamiento y eutanasia). Dunan y col. (1989) señalan a su vez una incidencia del 5.7% en una zona endémica donde la prevalencia en población asintomática es de 12.2%. Morillas Márquez y col. (1989) citan en Granada una incidencia del 5%. (Prevalencia 8.8%, Reyes Magaña y col., 1988). Nuestros resultados, 5.7% de incidencia anual junto a una prevalencia de la infección de 10.2%, se asemejan a los datos citados en otros focos del Mediterráneo, indicándonos que nos encontramos ante un foco realmente activo.

#### IV.3.5. EVOLUCION CLINICO-SEROLOGICA

Para dilucidar el significado de las serologías halladas y poder relacionarlas con la clínica, se han realizado estudios de evolución con grupos de animales controlados durante diferentes tiempos (IV.2.6., pag.140).

##### A) Evolución espontánea de los animales con serología elevada en el período de un año (IV.2.6.1., pag.141)

Destaca el porcentaje importante de animales que han sido exitus (35.3%) y que en su mayoría poseían títulos elevados entre 1/1600 y 1/6400. Es de remarcar que el porcentaje incrementa a un 65% al considerar el grupo de los animales sintomáticos.

La tasa de anticuerpos se mantiene estable en la mayoría de los casos. Tan solo el grupo de animales con serología 1/800 sufre evolución generalmente positiva, mientras que los animales con títulos superiores mantienen sus valores estables (Tabla 14, pag.141). Es de destacar que en el grupo de animales

con serología 1/800 se observan evoluciones discordes con tendencia negativa (5/34), aunque en 4 de ellos el descenso no ha sido significativo (descenso de tan solo un título: serología 1/400), pero que sin embargo es importante de señalar al hallarnos rozando el umbral de positividad.

La clínica presentada por estos animales ha mostrado que existe una evolución clara de la sintomatología (Tabla 15), que puede ser más o menos prolongada, destacando dos comportamientos:

- 1- Evolución clínica crónica, caracterizada por la evolución lenta y progresiva de la sintomatología, desde el estado asintomático hasta el estado sintomático y la muerte posterior. Es un proceso que puede durar varios años y afecta al 64.7% de los animales.
- 2- Evolución clínica rápida o aguda, observada en los animales asintomáticos que son exitus en menos de un año. Afecta al 35.3% de los animales.

La regresión de la sintomatología, en el conjunto de animales estudiados, es inapreciable en este período.

Al ampliar el estudio a un período de tiempo más largo, de varios años, aparece un pequeño porcentaje de animales (15%) que experimentan una regresión espontánea de la enfermedad.

Las formas regresivas o de resolución espontánea se han observado en 7 animales (15%) con serología previa positiva (dos casos confirmados parasitológicamente) y clínica muy poco manifiesta (asintomáticos u oligosintomáticos). Los estudios serológicos posteriores han permitido observar una disminución notable de la tasa de anticuerpos que, sin llegar a negativizar, se situó por debajo del umbral de positividad.

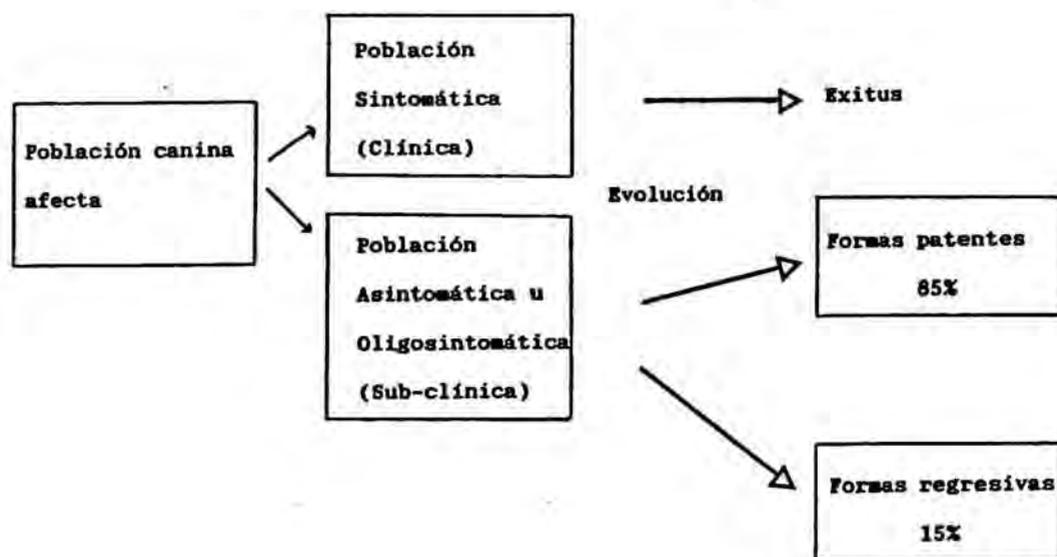


Fig. 17. Evolución clínica esquemática de la población canina positiva (títulos de anticuerpos  $\geq 1/800$  y/o cultivo positivo), de acuerdo con los resultados obtenidos.

E.C: Evolución crónica; E.A: Evolución aguda.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Lanotte y col. (1979) al estudiar la evolución natural de la leishmaniosis canina, quienes engloban los animales afectados en dos grandes grupos según su sintomatología: las formas patentes y las formas latentes que incluyen el estado pre-patente. Así mismo describen la existencia, largamente sospechada, de leishmaniosis de resolución espontánea en animales asintomáticos (10%).

Las formas regresivas también han sido observadas por otros autores. Pozio y col. (1981a) citan porcentajes mucho mayores, considerando que un 52% de los animales asintomáticos se recuperan y tan solo el 48% restante evoluciona hacia el estado patente y el exitus. Entre los animales sintomáticos

detectan un 88% de muertes en el período de un año, porcentaje superior al detectado en nuestro estudio para el mismo período. Sánchez Botija en 1936 ya citaba la existencia de animales en los que la enfermedad evolucionaba hacia la curación. Dunan y col. (1989) advierten de la existencia de animales con serologías significativas transitorias y mencionan la posibilidad de que sean debidas a posibles contaminaciones con el parásito que el perro es capaz de superar con éxito.

B) Evolución espontánea de los animales con títulos bajos, poco significativos, durante un período aproximado de 6 meses (IV.2.6.2., pag.146).

Aparecen dos comportamientos distintos (Tabla 16, pag.146):

1. Los animales que sufren una elevación significativa de su tasa de anticuerpos y que representa el grupo con leishmaniosis incipiente detectada en fase inicial (10-20%).

El primer control se realizó coincidiendo con las campañas oficiales de vacunación de la rabia, entre los meses de mayo, junio y julio, y el segundo control en el mes de septiembre, época que se considera de máximo riesgo epidemiológico (Marrugat y col., 1991). Conociendo que el período de incubación de la enfermedad en la naturaleza es largo, entre 3-8 meses o incluso más (Lanotte y col., 1979; Gradoni y col., 1988; Vidor y col., 1991), es de suponer que la elevación del título ha sido consecuencia de una primoinfección presente ya en el primer control. No debe, sin embargo, descartarse la posibilidad de que se hubieran producido nuevas inoculaciones durante el período estival.

2. Los animales que mantienen sus títulos bajos, que representan el 80-90% y cuyo significado es difícil de interpretar. Estos títulos podrían ser consecuencia de:

-contactos hospedador-parásito que no han prosperado, ya sea porque el perro ha sido capaz de responder con éxito frente al parásito, o bien porque las cepas de *Leishmania* inoculadas han sido de baja virulencia (Mauel y Behin, 1987), o porque el inóculo inicial ha sido insuficiente (Mauel y Behin, 1987).

-que el animal se encuentre en el período pre-patente de la enfermedad, cuya duración real se desconoce.

-leishmaniosis regresivas que hayan sido detectadas en sus fases finales, cuando los animales ya han sufrido un receso serológico importante e indicativo de la mejora del individuo frente a la enfermedad.

-que las cepas inoculadas sean de baja antigenicidad (Mauel y Behin, 1987), por lo que no activan de forma eficiente la respuesta humoral.

-una baja respuesta humoral del hospedador frente al agente causal, de modo que el perro no haya sido capaz de desarrollar una respuesta humoral importante, frente a una leishmaniosis realmente instaurada, acompañada o no de clínica.

-reacciones no específicas, como citan diversos autores. Dunan y Toga (1988) consideran que, en perros, los títulos bajos de IFI (1/50) se deben en un 50% a leishmaniosis incipientes precozmente detectadas, y el 50% restante a reacciones

inespecíficas, principalmente por citomegalovirus e hipergammaglobulinemias. Lanotte (1975) halla, a estos títulos, reacciones cruzadas con toxoplasmosis y babesiosis también mediante la técnica de IFI.

Clínicamente (Tabla 18), durante el primer control, un elevado porcentaje de los animales han sido considerados como asintomáticos u oligosintomáticos (88%), lo que parece concordar con las bajas serologías halladas. Destaca un grupo de animales (12%) en los que se observa una disociación clara entre serología y sintomatología, al presentar clínica aparente con resultados serológicos poco significativos. Al transcurrir el período de control (6 meses), un 17.3% de animales han sido considerados sintomáticos, donde se incluyen animales con una leishmaniosis evolutiva, con incrementos en su serología, y animales con serologías permanentemente bajas. Ello induce a pensar en la posibilidad de que existan animales que no sean capaces de producir una respuesta humoral importante, posibilidad apuntada ya por Dunan y col. (1989). Se considera que la respuesta humoral puede jugar un cierto papel en la patogénesis de la enfermedad y en la protección contra la reinfección (Bourdeau, 1988), pero la resolución de la enfermedad depende fundamentalmente de la respuesta inmunitaria mediada por células (Evans y col., 1990), que está deprimida durante la infección (Howard, 1985; Carvalho y col., 1985; Brandonisio y col., 1989; Martínez Moreno y col., 1991).

#### IV.3.6. INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS PROPIAS DEL ANIMAL

Las características individuales de los animales, como son la edad, el sexo, la longitud del pelo, el peso y la actividad, pueden influir en su predisposición a adquirir la enfermedad (IV.2.7., pag. 149).

Se ha observado una relación estadísticamente significativa entre la edad y el padecimiento de la enfermedad (IV.2.7.1., pag.150), de modo que se detecta un aumento de la prevalencia al aumentar la edad, a pesar de que la incidencia de la enfermedad es semejante en los distintos grupos de edad, sean jóvenes o adultos (IV.2.5., pag.140). Ello es lógico si se considera que la leishmaniosis se mantiene durante años en un mismo foco y que se comporta como una enfermedad crónica en muchos de los animales. El grupo con 5-6 años ha sido el más afectado (17.6%), produciéndose un descenso en el grupo de animales viejos,  $\geq 7$  años. El porcentaje menor entre la población anciana puede ser debido a un distinto comportamiento frente a la parasitosis. Es posible que la mortalidad sea superior en este grupo, lo que provoca un descenso de la tasa de seroprevalencia, o que la población anciana haya adquirido un estado de resistencia lo que provocaría un descenso de la tasa de incidencia (Catarsini, 1981). Estos datos concuerdan con los presentados por Martínez Cruz (1989), Gómez Nieto y col. (1985) y Matas y Rovira (1989), quienes observan una disminución importante de la seroprevalencia entre la población anciana. Lanotte (1975) detecta un aumento ininterrumpido con la edad del animal, Pozio y col. (1981a) y Cañavate y col. (1990) hallan porcentajes constantes al envejecer la población y Bettini y col. (1985) encuentra la mayor prevalencia entre los animales de 4-5 años. Diverge, en cambio, de los resultados expresados por Marty y col. (1986, 1988b) quienes no observan diferencias estadísticas según la edad del animal.

También el sexo (IV.2.7.2., pag.151) parece jugar un papel importante, ya que se ha detectado un mayor número de casos entre los machos, coincidiendo con Lanotte (1975), Martínez Cruz y col. (1990) y Bettini y col. (1985). En otras zonas, Marty y col. (1988b), Pozio y col. (1981a), Cañavate y col. (1990) no hallan diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, en el presente estudio, al considerar el sexo según

los distintos grupos de edad, esta diferencia ha desaparecido entre el grupo de animales jóvenes (1-4 años) y sólo ha sido significativa entre los animales adultos (5-6 años), donde pueden influir otros factores. La gestación puede ser un factor importante, ya que puede agudizar la evolución de la enfermedad, incrementando la mortalidad de este grupo de población. Se ha observado que casi la mitad de las hembras leishmaniósicas en estado de gestación han empeorado rápidamente, siendo exitus durante el parto o en el postparto.

La longitud del pelo no parece influir (IV.2.7.3., pag.153). No se han encontrado diferencias según el pelaje de los animales, aunque otros autores encuentran resultados distintos. Martínez Cruz (1989) halla el mayor porcentaje entre los perros con pelo largo y Gómez Nieto y col. (1985) entre los perros con pelo corto y medio.

El tamaño del animal tampoco parece influir (IV.2.7.4., pag.154). No se han observado diferencias estadísticas significativas, aunque aumenta el porcentaje de positividad al aumentar el tamaño del animal. Según Bray (1982) al aumentar el tamaño aumenta el espacio o volumen atractivo del animal frente al vector.

La actividad (IV.2.7.5., pag.155) que desarrolla el animal en su hábitat ha sido citado como factor predisponente, sobre todo entre los animales de caza (Rioux y col., 1970; Lanotte, 1975; Catarsini, 1981; Bettini y col., 1985; Castillo Hernández y col., 1985). Sin embargo, no se han observado diferencias entre la población estudiada por nosotros, donde los animales poseen hábitos muy similares. Marty y col. (1988b) encuentra estos mismos resultados en la zona de los Alpes Marítimos.

#### IV.3.7. DISTRIBUCION ESPACIAL DE LA LEISHMANIOSIS

Para conocer la distribución espacial de la leishmaniosis canina en la comarca, que permita delimitar la extensión del foco e identificar las zonas de máxima prevalencia, que pueden representar "microfocos" (Abranches y col., 1983b; Marty y col., 1986), se han realizado distintos estudios por localidades (IV.2.8.1., pag. 156), por áreas delimitadas previamente (10x 10 Km) (IV.2.8.2., pag. 164) y por altitudes (IV.2.8.3., pag. 166).

Se ha estudiado la prevalencia de animales en los que la serología ha superado el umbral de positividad y se ha calculado la inversa de la media geométrica de sus títulos (TGM), que es un índice que expresa el estado inmunológico general de la población canina de la zona considerada y permite comparar entre sí los resultados serológicos obtenidos.

Según los resultados hallados (Figs. 22, 23, 24, pags. 161, 162, 165, respectivamente), y teniendo en cuenta la fisiografía de la comarca (III.1., pag. 39), se han considerado dos grandes bloques, separados por la barrera natural de macizo del Montsant:

- Zona de alta endemia, que comprendería el Priorat histórico ampliado al denominado Priorat geológico y el Bajo Priorat (Pm=11.9%, TGMm=20.0).
- Zona de baja endemia constituida por el Alto Priorat, que comprendería la "Fossa de Cornudella-Ulldemolins" al NE y parte de la "Baronia de Cabassers" al NO (Pm=4.5%, TGMm=7.0).

En la zona de alta endemia que engloba las áreas definidas como C, D, E y F aparecen varias localidades donde la prevalencia detectada es muy alta y su TGM elevada, que podrían considerarse como microfocos dentro del conjunto. Destacan las localidades de Torroja (Pm=22.1, TGMm=74.3, Ia=13.4), La Venta del Pubill (Pm=28.9, TGMm=88.9) Poboleda (Pm=18.6, TGMm=13.0, Ia=12.5), Vilella Baixa (Pm=16.7, TGMm=85.8, Ia=9.3) y LLoà (Pm=26.7, TGMm=202.6), situadas en la zona norte del Priorat Geológico (de suelos esquistosos). En el Bajo Priorat destaca la población de Els Guiamets (Pm=21.2, TGMm=40.6).

En la zona de baja endemia, que comprende las áreas descritas como A y B, las prevalencias detectadas en la mayoría de las localidades son nulas y las TGM bajas, que indican que existen animales con títulos serológicos bajos y por tanto que existe contacto parásito-reservorio. Destaca la población de Cornudella Pm=7.7%, situada en los límites de los dos grandes bloques definidos, y que podría ser un reflejo de la dispersión que puede sufrir la leishmaniosis gracias a la movilidad del reservorio, ya que el vector en este punto está presente en densidades muy bajas.

No parece que la densidad de la población canina influya de forma importante en la prevalencia de la leishmaniosis, al menos en la zona de alta endemia del foco. Sin embargo, es de remarcar la menor densidad canina global que se encuentra en las zonas de baja endemividad, que comprende las áreas A y B (Tabla 27, pag. 164), debido fundamentalmente al escaso número de poblaciones existentes en esta zona, aunque las densidades caninas puedan ser importantes. Se ha de tener en cuenta que entre los dos grandes bloques existen además otros factores diferenciadores que pueden influir profundamente, como son la altitud, el clima y por tanto la vegetación. Rioux y col. (1968b, 1970) no hallan relación entre las densidades caninas y la aparición de la enfermedad en las Cevennes, por

lo que consideran que el factor limitante no es el perro sino el flebotomo vector. Pozio y col. (1981a) tampoco hallan ninguna relación en Monte Argentario (Toscana), detectando las mayores prevalencias donde la densidad canina es menor. Estos datos difieren de los presentados por Marty y col. (1986) en los Alpes Marítimos, donde observan una estrecha relación.

La altitud (Tabla 28, pag. 166) ha aparecido como un factor importante en la distribución de la leishmaniosis canina, como citan ciertos autores (Rioux y col., 1970; Gradoni y col., 1988), observándose una correlación importante entre la altura y la prevalencia, y entre la altura y la TGM. Los dos grandes bloques descritos difieren también en sus altitudes, situándose la zona considerada de alta endemia entre los 200-500m. Ello coincide con las apreciaciones realizadas por Rioux y col. (1970) en las Cevennes (Francia), quienes definen la zona de alto riesgo entre estas altitudes. La zona de baja endemia es en general una zona de altitudes mayores (>500 m), destacando la zona del NO que, aunque presenta altitudes entre 300-400m, que llegan hasta 800m, está separada del resto por el macizo del Montsant y posee un microclima especial con influencias climáticas continentales.

#### IV.3.8. IDENTIFICACION DEL PARASITO

La identificación de las cepas caninas aisladas (IV.2.9.) ha permitido observar la existencia en condiciones simpátricas y/o sintópicas de tres zimodemas próximos según sus perfiles enzimáticos, MON-1 y MON-77, MON-105, que difieren tan solo en el enzima G6PD.

El zimodema MON-1, habitualmente hallado en la región mediterránea en las formas viscerales humanas y caninas, ha sido aislado en 19 perros (20 cepas) por punción ganglionar, y el zimodema MON-77 en 5 perros (7 cepas), tanto de punciones

ganglionares como de lesiones cutáneas, lo que indica su carácter dermo-viscerotropo en el perro. El zimodema MON-105 ha sido únicamente aislado en un perro del Priorato (animal n°436) después de sucesivos controles (Rioux, J.A., com. pers.), y en un flebotomo alimentado sobre él (Moreno, 1989), en estudios realizados sobre este animal en el Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier. Este perro, del cual se aisló en un principio los dos zimodemas circulantes en el foco MON-1 y MON-77 en condiciones sintópicas (Tabla 30, pag.170) de ganglio y lesión cutánea respectivamente, presentó tras los sucesivos controles los tres zimodemas, sin que se demostrase un tropismo marcado para cada uno de ellos (Pratlong y col., 1989a; Rioux, J.A., com. pers.).

El enzima G6PD presenta, según su movilidad electroforética, tres electromorfos G6PD<sup>100</sup>, G6PD<sup>102</sup> y G6PD<sup>105</sup>. G6PD<sup>102</sup> representa el electromorfo compuesto que se expresa como una banda espesa o gruesa situada entre dos bandas (alozimas), una más lenta y otra más rápida. Según Moreno (Moreno, 1989) MON-1 (G6PD<sup>100</sup>) y MON-105 (G6PD<sup>105</sup>) representarían los homocigotos en el locus de la G6PD, y MON-77 (G6PD<sup>102</sup>) llevaría el fenotipo heterocigoto en este locus.

La presencia de estos zimodemas próximos en condiciones simpátricas y sintópicas evoca la posibilidad de que existan ocasionalmente intercambios genéticos (Rioux y col., 1986a; Moreno, 1989; Pratlong y col., 1989a). Esta posibilidad aparece reforzada por distintos trabajos sobre isoenzimas (Maazoun y col., 1981b; Le Blanq y col. 1986a; Moreno, 1989), trabajos sobre el ADN<sub>k</sub> (Evans y col., 1987b) y ADN<sub>g</sub> (Pages y col., 1989), así como por el trabajo recientemente expuesto por Lanotte y Rioux (1990), en el que demuestran la fusión de promastigotes de *L.infantum* y de *L.trópica* en un individuo único, en un proceso de citogamia.

Es de señalar que ninguna cepa identificada hasta el momento en el perro ha pertenecido al zimodema MON-29, el cual se conoce que circula en el foco (Rioux y col., 1986a; Moreno, 1989), ya que ha sido aislado repetidas veces del vector, tanto de *P. perniciosus* como de *P. ariasi*. En otros focos catalanes ha sido identificado como agente causal de leishmaniosis cutáneas humanas (Rioux y col., 1985; Portús y col., 1989) y aislado en el vector (Rioux y col., 1986a), pero su reservorio resta por dilucidar.

V. ESTUDIO DE LA  
LEISHMANIOSIS EN OTROS  
RESERVORIOS

## V. ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS EN OTROS RESERVORIOS.

En la zona mediterránea, al lado del reservorio canino, otros animales han sido, también, hallados infestados por *Leishmania* en la naturaleza: *Rattus rattus* (Petrovic y col., 1975; Bettini y col., 1980; Benavides y col., 1985) y el zorro (Rioux y col., 1968a; Bettini y col., 1980; Marín Iniesta y col., 1982; Abranches y col., 1983a; Abranches y col., 1984; Alvar y col., 1990c).

En el foco del Priorato, es posible que éstos u otros animales posean un papel epidemiológico importante, ya que se trata de un foco eminentemente rural, en el que se han aislado diversos zimodemas circulantes (MON-1, MON-29, MON-77, MON-105), entre ellos MON-29 de reservorio desconocido. MON-29 ha sido aislado repetidas veces del flebotomo vector (Rioux y col., 1986a) en dos poblaciones muy cercanas (Torroja y Poboleda) y, en cambio, no ha sido hallado en el reservorio canino.

Por ello, la búsqueda de otros posibles reservorios se ha orientado en dos vertientes:

1-Hacia los micromamíferos, por su hábitat peridoméstico, próximo a las localidades donde ha sido aislado del vector el zimodema circulante MON-29, de reservorio desconocido. El estudio se ha ampliado con el análisis de otros animales de la población: un rebaño de cabras y ovejas.

2.Hacia el zorro, ya que al ser el Priorato una zona eminentemente rural, donde este animal se halla presente, es posible que éste se comporte como un reservorio de *Leishmania*, al igual que ocurre en otros focos del Mediterráneo.

**MATERIAL Y METODOS**

## V.1. MATERIAL Y METODOS.

### V.1.1. MUESTREO.

#### V.1.1.1. Población prospectada.

Se han estudiado 123 micromamíferos procedentes de 6 biotopos cercanos a la población de Torroja, 68 cabras y 7 ovejas procedentes de la granja "Can Pamies" de Torroja del Priorat, y 16 zorros provenientes de distintos puntos del Bajo Priorat y Priorat histórico.

Micromamíferos	<i>Rattus spp</i>	17
	<i>Mus spretus</i>	69
	<i>Mus musculus</i>	9
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	28
Otros mamíferos	Cabras	68
	Ovejas	7
	Zorros	16

#### Biotopos prospectados:

- Biotopo A: Enclave próximo al río Ciurana, al pie de muros bajos de piedra, entre campos de avellanos y olivos. Situado a 1Km de Torroja, cerca del camino a Scala Dei.
- Biotopo B: Enclave situado en los bordes de un pequeño torrente con cañas y rodeado de pinos. A unos 3Km de Torroja, cerca del "Mas del Bruno", por el camino de tierra a Scala Dei.
- Biotopo C: Enclave situado en la masia llamada "Mas del Bruno", donde se ubica una granja de gallinas, a unos 3.5Km de Torroja por el camino de tierra a Scala Dei.

- Biotopo D: Granja "Can Pamies" de cabras y ovejas, rodeada de enseres viejos, situada a 100m de la población de Torroja.
- Biotopo E: Muros de piedra entre campos de avellanos a 3Km de Falset, cerca de la carretera nacional N420.
- Biotopo F: Incluye diversos enclaves situados cerca de la población de Torroja.

Los micromamíferos capturados, en los diversos biotopos muestreados, se indican en la Tabla 31.

	A	B	C	D	E	F
<i>Rattus spp</i>	0	0	15	2	0	0
<i>M.spretus</i>	59	2	0	1	0	7
<i>M.musculus</i>	0	0	9	0	0	0
<i>A.sylvaticus</i>	15	4	0	0	2	7

Tabla 31 Micromamíferos capturados en los biotopos prospectados.

#### V.1.1.2. Identificación del animal.

Los distintos micromamíferos se han identificado mediante una ficha individual y numerada, donde constan sus principales características: género y especie, sexo, peso y aspecto externo. Además se ha anotado la fecha y el biotopo de captura. Se indica también la metodología diagnóstica utilizada y los resultados obtenidos.

Hospedador: _____		N.º _____
Fecha: Lugar: Conj.:	Biotope:	
Sexo: CC: C: P: O: Peso: Actd.: LCB: LD: LM:	Observaciones: _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____	

Fig. 28. Ficha de identificación de los micromamíferos capturados.

Los demás mamíferos domésticos, cabras y ovejas, se han identificado por su número de placa, siguiendo la numeración otorgada por el veterinario titular encargado de realizar los diversos controles, y los zorros mediante un número otorgado por el Laboratorio.

### V.1.1.3. Sistema de muestreo.

Para la captura de los micromamíferos se han colocado trampas de vivo (Shermann) usando como cebo pan embebido en aceite o copos de avena, y trampas de muerto con pan con aceite. Las primeras se han utilizado, en los seis biotopos prospectados, para la captura de micromamíferos salvajes y las segundas en los biotopos C y D para capturar especímenes del género *Rattus*.

Las trampas se colocan al atardecer en los distintos puntos y se revisan por la mañana temprano para recuperar los animales capturados, que son llevados inmediatamente al laboratorio.

El muestreo de cabras y ovejas de la población de Torroja, biotopo D, se ha realizado coincidiendo con el control veterinario de la brucelosis.

La captura de zorros ha sido realizada por diversos cazadores de la población de Marçà, en distintos puntos del Priorato (1 ejemplar en Vilella Alta, 5 en Vilella Baixa, 2 en Bellmunt, 3 en LLoà, 1 en Gratallops, 3 en Marçà y el último de localización incierta), los cuales nos han proporcionado las muestras de sangre embebidas en papel de filtro.

### V.1.2. DIAGNOSTICO.

#### V.1.2.1. Diagnóstico etiológico.

Basado en el hallazgo del parásito ya sea por la visualización directa de la forma amastigota en frotis de los diversos órganos, hígado, bazo, médula ósea o corazón, o bien por el aislamiento de la forma promastigota después de cultivo en medio NNN.

La búsqueda de las formas parásitas se ha realizado en aquellos animales que, después de un cribado serológico, presentaban positividad a cualquiera de las diluciones ensayadas.

El estudio se ha llevado a cabo sobre los micromamíferos seropositivos, no siendo necesario en cabras y ovejas, ya que todas ellas han dado resultado negativo, y siendo imposible sobre los zorros, de los cuales tan solo se poseía muestras de sangre.

#### A. Toma de muestra

Una vez sacrificado el animal se han tomado muestras de los diversos órganos donde las leishmanias se encuentran con mayor intensidad, bazo, hígado y médula ósea, así como de riñón, corazón y sangre.

Técnica: Se trabaja con las mayores condiciones de esterilidad posibles, al lado de un mechero, y utilizando material estéril (pinzas, tijeras, placas de Petri, pipetas Pasteur).

Después de sacrificar el animal mediante traumatismo craneal, se inmoviliza en un soporte con las 4 patas bien estiradas. Se limpia con alcohol de 70° su zona ventral, flameándose unos segundos para lograr una mayor desinfección. Se abre el animal y, con ayuda de tijeras y pinzas estériles, se toman pequeñas muestras de los diversos órganos que se colocan en placas de Petri estériles, donde previamente se han vertido varios mililitros de solución salina estéril con penicilina (10.000 U.I./ml).

## B. Examen directo

Para observar la presencia de leishmanias u otras formas parásitas en las diversas muestras obtenidas, se han efectuado frotis directos sobre porta-objetos limpios y desengrasados. Tras fijación del frotis con metanol (5 min.) y secado, se ha procedido a la tinción con la técnica de Giemsa (IV.1.2.2.B, pag. ), y a la observación del frotis al microscopio a 400 y 1000 aumentos.

## C. Cultivo

De los animales seropositivos se ha realizado el cultivo, en medio NNN, de los distintos órganos muestreados, inoculando tres tubos de medio de cultivo para cada una de las muestras.

Se toman pequeñas porciones de los órganos y se trituran, en homogeneizadores estériles (Afora ref. V. 15445 N°10, y ANORSA ref. X. 4245) con 2 ml de solución salina estéril y penicilina (5.000 U.I. penicilina/ml). Con una pipeta Pasteur, se inocula tan solo unas gotas del material homogeneizado en los distintos tubos de medio previamente rotulados.

El medio se almacena en estufa a 27°C, revisándose a los 7 días para observar el crecimiento del protozoo en la fase líquida. Si es negativo, se resiembrá como mínimo 4 veces antes de considerar el cultivo como negativo.

## D. Inoculación al hamster dorado

El método de crecimiento *in vivo* ha sido recomendado por varios autores (Hoogstraal, 1963; Bettini y col., 1980) para

el aislamiento de cepas de *Leishmania* en mamíferos con bajas tasas de parasitación o difíciles de cultivar. Se ha practicado la inoculación al hamster dorado o hamster sirio, *Mesocricetus auratus*, una de las especies más utilizadas en los estudios de leishmaniosis (Pratlong, 1985; Martín Luengo y col., 1983).

La inoculación al hamster se ha realizado en 7 casos, inoculando los diferentes órganos sospechosos de presentar *Leishmania*.

Técnica: se inocular intraperitonealmente 1ml de homogeneizado de la muestra (V.1.2.1.C.), con ayuda de una jeringa ICO de 2 ml estéril con aguja 0.9x25, y se aísla el hamster para proceder a su seguimiento. A los dos meses, aproximadamente, es examinado minuciosamente para observar la aparición de lesiones en la piel u otras manifestaciones externas, como la onicogriposis (Pratlong, 1985). Después el animal es sacrificado y se toman pequeñas muestras de sus órganos para realizar frotis, cultivos o sub-inoculaciones a otro animal.

#### V.1.2.2. Diagnóstico inmunológico.

El diagnóstico inmunológico se ha practicado sobre 123 micromamíferos y 91 mamíferos (cabras, ovejas y zorros), como técnica de cribado para localizar los animales sospechosos de sufrir la infección.

##### A. Toma de muestra

Para el análisis serológico se han utilizado muestras de sangre completa recogidas sobre papel de filtro (Whatman, n°3).

### A.1. Micromamíferos

En los animales capturados con trampas de vivo, la extracción de sangre se ha realizado directamente del corazón con jeringa de 2 ml (ICO estéril), inmediatamente después de sacrificar el animal. La sangre extraída, aproximadamente 1ml, se impregna en el papel de filtro, previamente numerado.

En los animales capturados con trampa de muerte, la totalidad de los *Rattus*, y en los que por diversas razones llegan muertos al laboratorio, se ha procedido a su apertura por la zona del tórax, para localizar el corazón y sus zonas próximas. Se ha recogido la sangre, con ayuda de una pipeta Pasteur, y se ha embebido en el papel de filtro correspondiente. Es, por lo tanto, muy importante realizar la recogida de los animales y la extracción de sangre lo más rápidamente posible después de su muerte, para asegurar la presencia de sangre sin coagular.

### A.2. Otros mamíferos

En los animales domésticos: la sangre se ha extraído de la vena yugular, mediante agujas 1.1x40 mm y tubos "vacutainer". Después, se ha embebido y dejado secar completamente, en los papeles de filtro previamente identificados.

En los zorros: las muestras de sangre han sido tomadas por los mismos cazadores sobre papeles de filtro, sobre los que se hacían constar sus reseñas.

### B. Conservación de la muestra

Las muestras se han conservado en nevera a 4°C hasta el momento de su análisis, que ha sido generalmente inmediato

a la extracción. Posteriormente se han almacenado en congelador a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

### C. Preparación de la muestra

Las muestras se han eluido en el tampón de trabajo, TST-leche 1%, a la dilución mínima a ensayar, 1/50, en todos los casos.

La elución se realiza en agitación constante durante una hora, calculando la dilución 1/50 como la correspondiente a un disco de 6 mm de diámetro de papel eluido en 125  $\mu\text{l}$  de tampón.

### D. Técnica serológica utilizada: "Dot-ELISA"

Para el análisis de los micromamíferos se ha empleado la técnica "Dot-ELISA"-Proteína A-PO, utilizada para el diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina descrita en el apartado IV.1.2.3.2.A.2., pag.72.

La utilización de la Proteína A -Peroxidasa permite trabajar con un mismo conjugado para distintas especies animales (Tabla 6, pag.75):

- en la rata, reacciona intensamente con la IgG1 e IgG2c, en menor intensidad con la IgG2b y no reacciona con la IgG2a. Con otras clases de inmunoglobulinas no se conoce exactamente su reactividad.
- en el ratón, reacciona intensamente con la IgG2a e IgG2b y en menor medida con la IgG1. Tampoco es conocida la reactividad con otras clases de inmunoglobulinas.

- en las cabras, reacciona intensamente con la IgG2 y con menor intensidad con la IgG1.
- en las ovejas, reacciona fuertemente con la IgG2 y es incapaz de unirse a la IgG1.

-Ensayo de la reactividad de la proteína A frente a sangre de diversos mamíferos.

Se ha comprobado la reactividad de la Proteína A frente a las distintas especies de micromamíferos capturados, roedores (*Rattus*, *Mus*, *Apodemus*) y un insectívoro (*Crocidura*), y frente a las ovejas, las cabras y los zorros.

Técnica: se fija en una membrana de nitrocelulosa totalmente seca, que ha sido previamente humedecida en el tampón de trabajo TS, pequeñas gotas de sangre de los distintos animales a ensayar. Después de una hora en estufa a 37°C, para favorecer la fijación, se procede al bloqueo de la placa con TS-leche 5%. Se incuba la Proteína A-PO a diversas diluciones y se procede al revelado con el substrato cromogénico.

Se ha observado la aparición de color, que se interpreta como la capacidad de la Proteína A de reaccionar con las Ig, en las tres especies de roedores y en los demás mamíferos ensayados. La reactividad es nula frente al insectívoro *Crocidura russula*.

La dilución 1/2000 se ha considerado como la dilución de Proteína A óptima a utilizar para el análisis de estos animales.

**RESULTADOS**

V.2. RESULTADOS

V.2.1. MICROMAMIFEROS

Los resultados de los 123 micromamíferos estudiados mediante la técnica serológica "Dot-ELISA"-Proteína A-PO, utilizada como técnica de cribado (V.1.2.2.D., pag. 202), de los cultivos realizados de los diversos órganos (médula ósea, hígado y bazo) y de la observación de sus frotis, se muestran en la Tabla 32.

ESPECIES	Dot-ELISA	CULTIVO	FROTIS
	Pos./Total	Pos./Total	Pos./Total
<i>Rattus spp</i>	0/15	0/10	0/11
<i>Mus spretus</i>	7/69	0/11	0/11
<i>Mus musculus</i>	0/9	0/9	0/9
<i>Apodemus sylvaticus</i>	1/28	0/8	0/8
TOTALES	8/121	0/38	0/39

Tabla 32. Estudios realizados sobre los micromamíferos  
Pos./Total: n° positivos en relación al n° total estudiado

Un total de 8 animales (7 *Mus spretus* y 1 *Apodemus sylvaticus*) han dado reacción serológica positiva a títulos bajos, entre 1/50 y 1/400. De estos animales se han realizado cultivos de sus órganos en medio NNN y examen directo de sus improntas, previa tinción con el colorante de Giemsa, con el fin de detectar la presencia de *Leishmania* u otros tripanosomátidos que justificaran la positividad serológica observada,

obteniendo en todos los estudios resultados negativos. En tres *Mus spretus* se procedió a la inoculación intraperitoneal al hamster dorado sin ningún éxito.

#### V.2.2. OTROS MAMIFEROS

El análisis serológico de cribado realizado sobre las ovejas y cabras de la granja "Can Pamies", situada en la población de Torroja (Biotopo D), ha dado resultado negativo, por lo que no han sido realizados estudios posteriores.

El estudio serológico de los zorros ha puesto de manifiesto la existencia de animales con títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* bajos, entre 1/200 y 1/400 (Tabla 33). Sin embargo, la falta del material biológico ha imposibilitado su estudio posterior mediante examen directo y cultivo.

Título "Dot-ELISA"	N° zorros
negativo	9
1/200	5
1/400	2

Tabla 33 Títulos "Dot-ELISA" hallados en los zorros analizados.

**DISCUSSION**

### V.3. DISCUSION

#### V.3.1. ORIENTACION DE LA BUSQUEDA

La búsqueda de otros posibles reservorios ha sido estimulada por el hallazgo de animales parasitados por *Leishmania infantum*, como ratas y zorros, en diversos focos del Mediterráneo, que abren un interrogante acerca de su verdadero papel en la cadena epidemiológica.

En nuestro foco, trabajos previos (Rioux y col., 1986a; Moreno, 1989) habían demostrado la presencia, en dos poblaciones muy cercanas del Priorato (Poboleda N°18 y Torroja N°22), de un zimodema circulante, MON-29, aislado repetidas veces en flebotomos, *P. perniciosus* y *P. ariasi*, y no aislado en el reservorio canino. Los posteriores aislamientos del parásito en perros de estas poblaciones no han resuelto el problema (Tabla 30, pag. ), ya que las 19 cepas aisladas y tipificadas enzimáticamente han pertenecido a los dos zimodemas circulantes en el perro, el zimodema MON-1 (13 cepas aisladas en ganglio poplíteo) y el zimodema MON-77 (6 cepas: 4 aisladas en ganglio y 2 en lesiones cutáneas). Ello ha promovido la búsqueda de otros reservorios, orientada fundamentalmente sobre los roedores, que aparecen como máximos sospechosos por su hábitat peridoméstico o silvestre, pero en definitiva próximo a las localidades en estudio.

Se han analizado, además, otros animales de la población de Torroja: un rebaño de cabras y ovejas. Los gatos no han podido ser estudiados por la dificultad que comporta la toma de muestra, pero futuros esfuerzos se harán en este sentido. Son escasos los casos citados en la literatura si bien se dan casos aislados: en Suiza, un gato que había visitado España (Molyneux y Ashford, 1983), en Brasil (Grimaldi y col., 1989) y en Texas (Craig y col., 1986; Grimaldi y col., 1989).

Así mismo, el estudio se ha ampliado con el análisis de un pequeño número de zorros capturados en la comarca, ya que el zorro, varias veces hallado parasitado en focos del Mediterráneo (Rioux y col., 1968a; Bettini y col., 1980; Marín Iniesta y col., 1982; Abranches y col., 1983a; Abranches y col., 1984; Alvar y col., 1990c), podría ser en esta zona un posible reservorio, aunque no parece que pueda explicar la presencia importante del zimodema MON-29 en la localidad de Torroja, por su hábitat salvaje y lejano. Su estudio no ha podido ser realizado en profundidad por la dificultad que comporta obtener los animales. Sin embargo nuevos trabajos se orientan en esa dirección para discernir su posible papel en la dinámica del foco.

#### V.3.2. ESTUDIO SOBRE LOS MICROMAMIFEROS Y MAMIFEROS DE LA COMARCA.

El estudio se ha llevado a cabo sobre 123 micromamíferos, 68 cabras y 7 ovejas de las cercanías de la población de Torroja, y 16 zorros del Bajo Priorat y del Priorat histórico (zona de alta endemia).

La técnica "Dot-ELISA", utilizada para el estudio de la leishmaniosis canina, ha sido aplicada al estudio de estos animales, como técnica de cribado, después de comprobar la capacidad de la Proteína A de unirse a sus inmunoglobulinas. La técnica "Dot-ELISA" ha sido también utilizada para el estudio de roedores (Giannini, 1985), concretamente sobre *Rattus norvegicus* experimentalmente infestados. Otros autores han utilizado también técnicas serológicas para detectar anticuerpos anti-*Leishmania* en diversos animales: IFI en ratas y zorros (Gradoni y col., 1983; Abranches y col., 1984), fijación de complemento en zorros (Rioux y col., 1968a), etc.

### V.3.2.1. Micromamíferos

Los resultados (Tabla 32, pag.205) han mostrado la presencia de anticuerpos en 8 animales (7 *Mus spretus* y 1 *Apodemus sylvaticus*) a títulos bajos, entre 1/50 y 1/400, frente al antígeno *Leishmania*, cuyo significado no se ha logrado esclarecer. Ninguno de los diversos métodos utilizados para el hallazgo de las formas parásitas (cultivo, observación de los frotis previa tinción e inoculación al hamster dorado), ha permitido observar *Leishmania* u otros tripanosomátidos que pudiesen explicar los títulos serológicos hallados. En la literatura se han citado casos de parasitismos por tripanosomas en *Rattus rattus* por *Trypanosoma lewisi* (Rioux y col., 1968a), en *Mus* por *Trypanosoma musculi* (Molineux y Ashford, 1983), en *Apodemus* por *Trypanosoma grosi* (Molineux y Ashford, 1983) y en *Crocidura russula* por *Trypanosoma crocidurae* (Santos Gomes y col., 1990).

El papel de los micromamíferos ha sido estudiado en otros focos del Mediterráneo (Rioux y col., 1968a; Petrovic y col., 1975; Ranque y col., 1977; Bettini y col., 1980; Benavides y col., 1985), pero tan solo la rata ha sido hallada parasitada por *Leishmania* en la naturaleza, aunque de forma esporádica. Destaca el hallazgo en Toscana, Italia, de 4 ratas parasitadas (Bettini y col., 1980; Pozio y col., 1981b), de las que han sido aisladas 4 cepas e identificadas como pertenecientes al zimodema MON-1 (Gramiccia y col., 1982b), principal agente responsable de la leishmaniosis visceral y canina en el Mediterráneo. Sin embargo, autores como Bray (1982) cuestionan su papel epidemiológico, ya que indican que la rata presenta una notable resistencia frente a *Leishmania*. Otros autores (Gradoni y col., 1983) abogan por su probable papel como reservorio, ya que consideran que en una población salvaje la heterogeneidad genética es amplia, de modo que existen animales que presentan distinto grado de susceptibilidad frente a la infección. En estudios realizados sobre ratas

infestadas experimentalmente, un 5% representaría la población susceptible, que sufre una infección masiva visceral, junto con una población que presenta una infección sub-patente, con bajos índices de parasitación que llegan a desaparecer en el tiempo, pero que pueden dar lugar a la instauración de la enfermedad y a la capacidad de infestar al flebotomo vector, cuando se produce una depresión de la respuesta inmune por problemas fisiológicos, como son la malnutrición, el estrés, las enfermedades, la vejez, etc.

Al lado de nuestros resultados, resalta el hecho de que ni *Mus* ni *Apodemus* hayan sido hallados parasitados por *Leishmania* en los estudios realizados en otros focos leishmaniósicos (Rioux y col., 1968a; Bettini y col., 1980).

#### V.3.2.2.Zorros

Se ha detectado anticuerpos anti-*Leishmania* (Tabla 33, pag.206) en 7 de los 16 zorros estudiados, a títulos bajos, entre 1/200-1/400. No ha sido posible realizar estudios posteriores, pero la presencia de un porcentaje (43.8%) tan elevado de animales con título serológico, aunque sea bajo, hace suponer su posible implicación en el ciclo epidemiológico del parásito en este foco. Es de destacar que en estudios serológicos realizados en nuestro Laboratorio, utilizando la misma técnica "Dot-ELISA", sobre zorros provenientes de zona no endémica, no se han detectado estos títulos.

Los zorros analizados provenían de la zona del Priorato de alta endemia canina (Area C: Vilella Alta, Vilella Baixa, LLoà y Gratallops; Area E: Bellmunt; Area F: Marçà) (Fig. 24, pag.165), donde el porcentaje de perros con títulos bajos entre 1/100 y 1/400 es elevado (alrededor 40%), y que coincide además con la zona donde las especies consideradas vectoras se hallan en elevadas densidades (Tabla 39, pag.238). Estos

datos se indican en la Tabla 34, donde no se ha incluido el análisis de un zorro de localización incierta, aunque capturado en la zona de alta endemia canina, y cuyo resultado serológico ha sido negativo.

AREA	TITULO 1/200-1/400		DENSIDAD VECTORES	
	Zorro (n/N)	Perro (%)	<i>P.perniciosus</i>	<i>P.ariasi</i>
C	5/10	42.3	27.9	4.1
E	2/2	45.4	33.9	7.8
F	0/3	41.8	28.8	4.5

Tabla 34. Análisis, por áreas, de los resultados serológicos de los zorros junto a los resultados indicativos de la endemia canina y de la presencia de las especies vectoras.

n: número de zorros con título serológico 1/200-1/400

N: número de zorros analizados

Ello induce a pensar que el zorro responde inmunológicamente (respuesta humoral) de modo parecido al perro (en conjunto en el foco se ha hallado un 40% de perros con títulos bajos indicativos de un posible contacto hospedador-parásito). El bajo número de animales analizados puede ser la causa de que no se haya detectado ningún animal con título serológico elevado, aunque debe indicarse que son necesarios futuros trabajos para conocer el verdadero significado de estos títulos y cuál debe considerarse el título diagnóstico. El hallazgo de zorros parasitados en otros focos del Mediterráneo, cuyas cepas se han identificado como correspondientes al zimodema MON-1 (Abranches y col., 1984) y al MON-82 (Moreno, 1989) refuerzan esta idea.

Otros carnívoros salvajes han sido también estudiados en la zona mediterránea sin que hayan podido detectarse infestaciones naturales (Rioux y col., 1968a; Ranque y col., 1977; Bettini y col., 1980), que permitan incriminarlos en el ciclo epidemiológico de *Leishmania*. En cambio, es conocido el papel de los chacales (*Canis aureus*) en focos soviéticos (Lysenko y Beliaev, 1977) de *Leishmania infantum* y de zorros (*Cerdocyon thous* y *Lycalopex vetulus*) en focos brasileños (Grimaldi y col., 1989) de *Leishmania chagasi*.

#### V.3.2.3. Cabras y ovejas

Referente a los animales domésticos, en todos los casos el resultado serológico hallado ha sido negativo. Ello concuerda con la literatura revisada, ya que no han sido citados casos que indiquen que puedan poseer un papel importante en la epidemiología de la leishmaniosis. Estudios serológicos realizados en Italia (Mansueto y col., 1985) sobre ganado bovino, ovino y equino señalan importantes porcentajes de seropositividad (10-26%). No obstante, ante la ausencia de manifestaciones clínicas y los bajos niveles de anticuerpos detectados, estos resultados son difíciles de valorar. Pocos y de significado incierto son los casos clínicos descritos, citándose casos en équidos en Venezuela, norte de Argentina, Colombia y Brasil por *L. brasiliensis* (Bonfante Garrido y col., 1981; Grimaldi y col., 1989). Sin embargo, ha sido citado el hallazgo de otros tripanosomátidos en ovejas *Trypanosoma melophagium* y en cabras *Trypanosoma theodori* (Molyneux y Ashford, 1983). Por otro lado los estudios sobre las preferencias tróficas del vector han mostrado que los flebotomos son capaces de alimentarse sobre estos animales: estudios con cebo vivo con trampas mosquiteras (Rioux y col., 1970; Killick-Kendrick y col., 1977) y estudios de identificación de la sangre ingerida en flebotomos capturados después de haber realizado la ingesta de sangre en condiciones naturales (Fraga

de Acevedo, 1948; Zivkovic y col., 1971; Zivkovic y Miscevic, 1973; Guy y col., 1984; Seguí, 1991; Botet, 1991a). Ello parece indicar que estos animales no se comportan como reservorios adecuados de *Leishmania*, por lo que los posibles contactos hospedador-parásito, gracias a la capacidad de las especies vectoras de alimentarse sobre estos animales y por tanto de inocular *Leishmania*, se expresan con una respuesta humoral baja o nula.

Todo ello suscita la hipótesis de que en el foco en estudio, al lado del perro como reservorio habitual, puedan existir otros animales que también actúen como reservorios, en especial el zorro, cuyo papel debe estudiarse en profundidad. También, entre los roedores, el reiterado hallazgo de *Mus spretus* con títulos serológicos incita a pensar en esta posibilidad. De todos modos el hallazgo ocasional de animales parasitados por *Leishmania* no es suficiente para incriminar a un animal como verdadero reservorio (Garnham, 1987). En conjunto, nuestros resultados, aunque abren nuevas posibilidades, no permiten llegar a resolver el problema suscitado por la presencia del zimodema MON-29 circulante en nuestro foco, cuyo reservorio resta por dilucidar.

VI. ESTUDIO DEL VECTOR:

LOS FLEBOTOMOS

**MATERIAL Y METODOS**

## VI. ESTUDIO DEL VECTOR: LOS FLEBOTOMOS

### VI.1. MATERIAL Y METODOS

#### VI.1.1. MUESTREO

##### VI.1.1.1. Elección de las zonas de muestreo.

Para conocer las especies de flebotominos presentes y su distribución en la comarca del Priorato, se realizó un muestreo durante el mes de julio de 1988, en diversos enclaves representativos de la geografía de la comarca.

Las estaciones se situaron tanto en los municipios donde se estudiaba simultáneamente la prevalencia de la leishmaniosis canina, como en otros enclaves rurales fuera de los núcleos urbanos, siguiendo las carreteras y caminos de la zona.

Los puntos muestreados fueron agujeros y fisuras en paredes de piedra y de cemento de casas, puentes, muros de contención de carreteras, así como cuevas y otros enclaves sospechosos de ser el lugar de reposo de los ejemplares adultos.

##### VI.1.1.2. Descripción de las zonas prospectadas

Se estudiaron 56 estaciones, distribuidas por toda la comarca (Fig. 29), anotando cuidadosamente su localización, tipo de enclave (muros, cuevas, etc.), altura y orientación:

E-8 Carretera La Serra d'Almos-Els Guiamets. Altitud: 177 m. Orientación: S-E. Paredes de una casa aislada y deshabitada, rodeada de pinos y avellanos.

- E-9 Carretera La Serra d'Almos-Els Guiamets. Altitud: 170 m. Orientación: N-E. Estación de ferrocarril abandonada y aislada, rodeada de pinos y zarzales. Muro de contención (mechinales).
- E-10 Carretera Els Guiamets-Capçanes. Altitud: 215 m. Orientación: S-O. Paredes de una masía abandonada y aislada.
- E-11 Marçà, municipio, en un extremo del pueblo. Altitud: 305 m. Orientación: E. Muro de piedra (mechinales), rodeado de olivos y almendros.
- E-12 Carretera Marçà-Torre de Fontaubella. Altitud: 270 m. Orientación: S. Pared al borde de la carretera, entre campos de avellanos.
- E-13 Carretera Marçà-Torre de Fontaubella. Altitud: 264 m. Orientación: S-O. Cuevas y agujeros en la roca, rodeado de pinos.
- E-14 Carretera Marçà-Torre de Fontaubella. Altitud: 351 m. Orientación: S-E. Casa abandonada y aislada, rodeada de olivos, algarrobos e higueras.
- E-15 Torre de Fontaubella, municipio. Altitud: 351 m. Orientación: E. Paredes en el interior de la localidad.
- E-16 Carretera Torre de Fontaubella-Pradell de la Teixeta. Altitud: 394 m. Orientación: E. Interior de los quemadores de residuos en una granja de pollos.
- E-17 Pradell de la Teixeta, entrada a la población. Altitud: 450 m. Orientación: S. Muro (mechinales) al lado de la carretera, rodeado de avellanos.
- E-18 Carretera N-420, de Falset a Reus, en la bifurcación hacia Porrera, Coll De la Teixeta. Altitud: 536 m. Orientación: S. Casa abandonada y aislada.
- E-19 Carretera Coll de la Teixeta-Porrera. Altitud: 476 m. Orientación: S-E. Pared de cemento (mechinales), cerca de una fuente y rodeada de avellanos.
- E-20 Porrera, municipio. Altitud: 308 m. Orientación: O. Paredes en el interior de la localidad y en los alrededores.
- E-21 Falset, municipio. Altitud: 350 m. Orientación: Diversa. Paredes de la localidad y del castillo en ruinas.
- E-22 El Masroig, municipio. Altitud: 183 m. Orientación: N. Paredes de la localidad.

- E-23 Carretera El Masroig-El Molar. Altitud: 101 m. Orientación: E/O. Puente de la carretera, rodeado de pinos.
- E-24 El Molar, municipio. Altitud: 230 m. Orientación: E/O. Paredes de la localidad.
- E-25 Camino de tierra El Molar-Bellmunt del Priorato. Altitud: 222 m. Orientación: S. Casa abandonada y aislada, rodeada de pinos.
- E-26 Camino de tierra El Molar-Bellmunt. Altitud: 128 m. Orientación: S. Casa vieja aislada, rodeada de pinos.
- E-27 Camino de tierra El Molar-Bellmunt. Altitud: 172 m. Orientación: S. Cuevas al lado del camino.
- E-28 Camino de tierra El Molar-Bellmunt. Altitud: 189 m. Orientación: S-E. Muro de contención (mechinales).
- E-30 LLoà, municipio. Altitud, 216 m. Orientación: N-E. Paredes de la localidad.
- E-31 Carretera LLoà-El Molar. Altitud: 231 m. Orientación: S. Casa aislada rodeada de olivos y avellanos.
- E-32 Carretera El Molar-La Figuera. Altitud: 352 m. Orientación: N-O. Puente de la carretera.
- E-33 La Figuera, municipio. Altitud: 570 m. Orientación: N-E. Paredes de la localidad.
- E-34 Carretera La Figuera-Cabassers, después de la bifurcación de la Bisbal de Falset. Altitud: 390 m. Orientación: S. Muro de contención al borde de la carretera.
- E-35 Cabassers, salida del municipio. Altitud: 325 m. Orientación: N-E. Puente de la carretera, rodeado de olivos y avellanos.
- E-36 Gratallops, municipio, salida de la localidad. Altitud: 315 m. Orientación: N-E. Muro (mechinales) al lado de la carretera.
- E-37 Vilella Baixa, municipio. Altitud: 210 m. Orientación: S-O/N-O. Paredes de las casas y muro (mechinales) al lado del río.
- E-38 Vilella Alta, municipio, salida de la localidad. Altitud: 330 m. Orientación: N-O. Paredes de las casas y muros.

- E-39 Carretera Vilella Baixa-Scala Dei. Altitud: 452 m. Orientación: N-E. Muros de contención (mechinales).
- E-40 Scala Dei, localidad. Altitud: 460 m. Orientación: E. Paredes de casas y muro cerca de un riachuelo.
- E-41 Camino de tierra Scala Dei-Torroja. Altitud: 367 m. Orientación: diversa. Masía "Mas del Bruno". Paredes y muros de la masía y granja de pollos anexa.
- E-42 Carretera La Figuera-La Bisbal de Falset. Altitud: 313 m. Orientación: S-E. Cuevas al lado de la carretera y pequeña casa rodeada de olivos.
- E-43 Margalef, municipio, entrada a la localidad. Altitud: 370 m. Orientación: S-E. Cueva grande al lado de la carretera y granja de animales.
- E-44 Carretera Margalef-Ulldemolins. Altitud: 470 m. Orientación: O. Muro del jardín (mechinales) de una casa aislada, rodeada de pinos.
- E-45 Carretera Margalef-Ulldemolins. Altitud: 680 m. Orientación: S. Cuevas en la roca, rodeadas de pinos.
- E-46 Carretera Margalef-Ulldemolins. Altitud: 780 m. Orientación: E. Casa aislada en ruinas, rodeada de pinos y almendros.
- E-47 Carretera Margalef-Ulldemolins. Altitud: 586 m. Orientación: O. Paredes de una granja de pollos, rodeada de árboles frutales.
- E-48 Ulldemolins, municipio. Altitud: 650 m. Orientación: E. Paredes de la localidad.
- E-49 Albarca, localidad. Altitud: 809 m. Orientación: N-O. Paredes y muros.
- E-50 Cornudella, municipio. Altitud: 550 m. Orientación: N. Muro (mechinales) y paredes de la localidad.
- E-51 La Morera, municipio. Altitud: 745 m. Orientación: S. Muro (mechinales) y paredes de las casas.
- E-52 Carretera La Morera-Cornudella. Altitud: 644 m. Orientación: S. Muro de contención de cemento (mechinales), rodeado de pinos y cultivos de secano.
- E-53 Camino de tierra Scala Dei-Torroja. Altitud: 345 m. Orientación: S-E. Barraca de piedra, rodeada de avellanos.

- E-54 Carretera Scala Dei-Poboleda. Altitud: 422 m. Orientación: S-E. Puente de la carretera.
- E-55 Carretera Scala Dei-Poboleda, entrada al pueblo de Poboleda. Altitud: 360 m. Orientación: S. Muro de contención de la carretera (mechinales).
- E-56 Carretera Poboleda-La Venta del Pubill. Altitud: 410 m. Orientación: S. Muro de contención de ladrillo (mechinales).
- E-57 Carretera La Venta del Pubill-Cornudella. Altitud: 456 m. Orientación: S-E. Pequeña casa aislada.
- E-58 Carretera La Venta del Pubill-Coll de l'Alforja. Altitud: 620 m. Orientación: E. Pequeña casa en ruinas, rodeada de pinos.
- E-59 Carretera Coll de l'Alforja-Arbolí. Altitud: 765 m. Orientación: S-E. Casa en ruinas aislada.
- E-60 Arbolí, municipio. Altitud: 720 m. Orientación: N-E. Paredes de las casas.
- E-61 Poboleda, municipio. Altitud: 350 m. Orientación: N-E. Paredes de las casas.
- E-62 Torroja, municipio. Altitud: 340 m. Orientación: E. Muros de piedra (mechinales).
- E-63 Bellmunt del Priorat, salida del municipio. Altitud: 277 m. Orientación: N. Muro de contención (mechinales).
- E-64 Carretera Bellmunt-Falset. Altitud: 333 m. Orientación: N. Muro de contención (mechinales).

#### VI.1.2. METODOLOGIA

La metodología utilizada para la captura, recolección, fijación y montaje, a lo largo del presente trabajo, ha sido la que de forma rutinaria se aplica en nuestro Laboratorio y descrita con detalle en Botet (1991a). En breve ha consistido en:

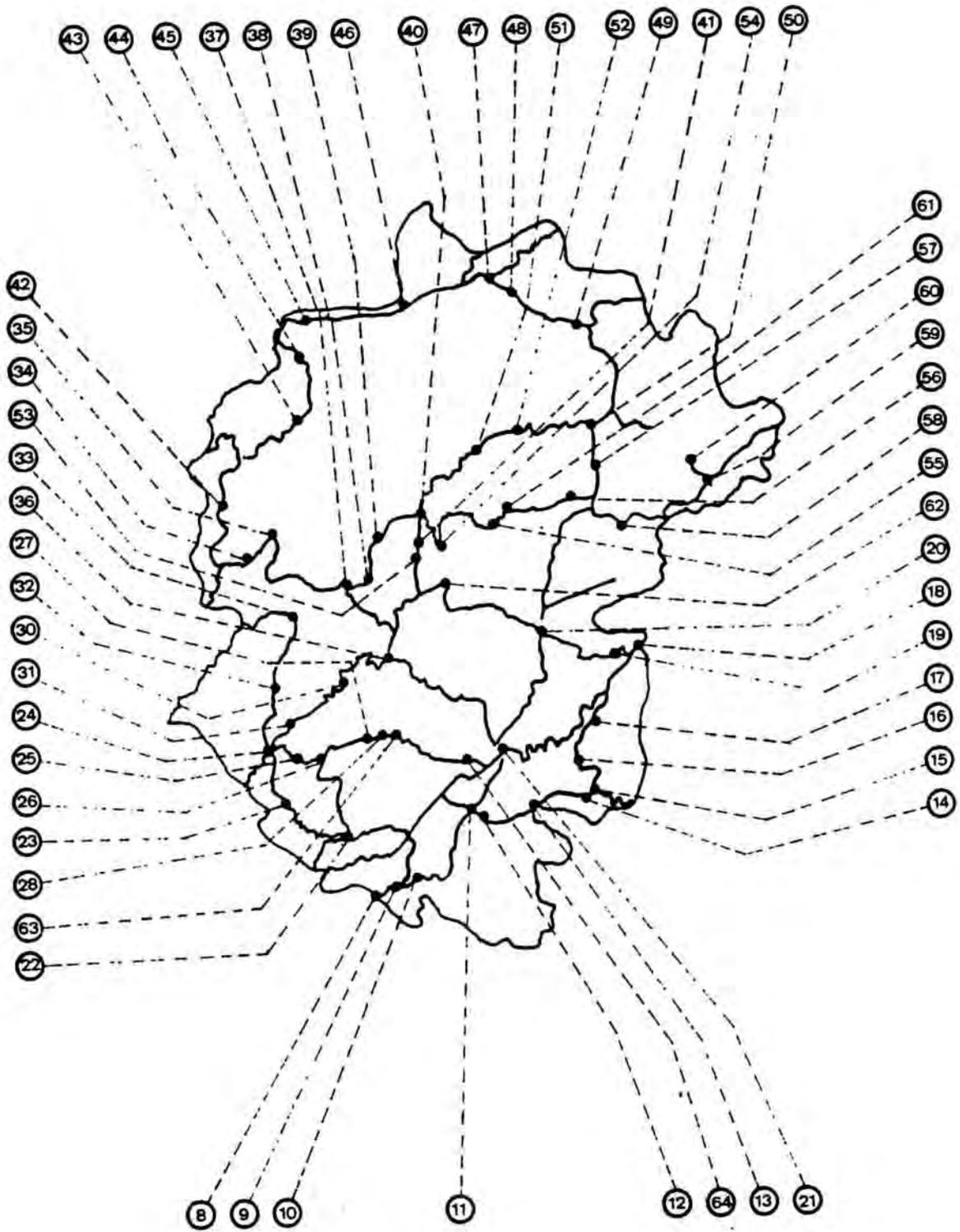


Fig.29. Estaciones prospectadas en la comarca del Priorato.

#### A. Sistema de captura.

Los sistemas de captura descritos son muy variables y se aplican con fines diversos y precisos: trampas adhesivas, trampas adhesivas luminosas, trampas de CO<sub>2</sub>, capturadores manuales, trampas Disney, trampas New Jersey o trampas mosquiteras con cebo vivo, etc (Croset y col., 1977; Rioux y col., 1968b).

Las trampas adhesivas son utilizadas y recomendadas por muchos autores (Rioux y col., 1969; Morillas Márquez, 1982; Martínez Ortega, 1985a; Lucientes Curdi, 1986) para realizar estudios de distribución geográfica y densidad poblacional, ya que permiten prospectar numerosas estaciones al mismo tiempo y son además de fácil aplicación. Sin embargo, manifiestan una cierta selectividad, tanto sobre el sexo (Rioux y col., 1968b) como sobre las especies capturadas (Botet, 1991a).

En nuestro estudio se utilizaron trampas adhesivas de papel blanco y de 20 cm de lado, embebidas en aceite de ricino purificado hasta adquirir una apariencia traslúcida. Este aceite posee propiedades especiales que lo convierten en un medio ideal: excelente viscosidad que favorece la adhesión del flebotomo, buena conservación y gran solubilidad en alcohol de 96<sup>0</sup>, lo que permite recuperar fácilmente los especímenes para su identificación posterior.

Los papeles se colocaron en lugares oscuros y protegidos del viento, considerados sitios de reposo de los flebotomos: en agujeros de muros y paredes de las casas, en cuevas, en muros de contención de carreteras, etc, manteniéndose extendidos, siempre que fue posible, con ayuda de soportes, para conseguir una mayor superficie de contacto. El número de papeles colocados fue variable,

según las características del enclave muestreado.

Las trampas fueron recogidas dos semanas después, aunque se calcula que dejaron de ser efectivas con anterioridad, debido a las condiciones de aridez presentes durante la época estival en la zona.

#### B. Recolección, fijación y montaje

La recolección de las trampas se realizó al cabo de dos semanas, agrupando los papeles de cada estación en paquetes de papel sulfurado, que aseguró su conservación para ser transportados al laboratorio. Los paquetes se identificaron por el número de estación, anotando la fecha de recolección, y se guardaron en nevera o en congelador cuando no fue posible realizar la recolección inmediata de los flebotomos, para evitar su deterioro.

Los flebotomos se recuperaron con ayuda de un pincel mojado en alcohol de 96<sup>o</sup>, capaz de disolver el aceite de ricino, y fueron introducidos con cuidado en viales con alcohol de 96<sup>o</sup>, previamente identificados. Después de 48 h. en este alcohol, para asegurar la completa disolución del aceite de ricino, se sustituyó por alcohol de 70<sup>o</sup>, donde se conservaron hasta proceder a su montaje.

El montaje de los flebotomos se realizó en líquido de Hoyer (Botet, 1991a) (Anexo 5 ), medio escogido por la rapidez y facilidad del montaje y la buena clarificación que proporciona. Pueden utilizarse otros medios como son el líquido de Marc André, o el montaje previa coloración con fucsina ácida; este último fue ensayado en nuestro Laboratorio (Rovira, 1990) comparándolo con el líquido de Hoyer, sin mejorar los resultados y apareciendo como una técnica más lenta y engorrosa.

### VI.1.3. IDENTIFICACION

Las preparaciones una vez secas se observaron al microscopio y se identificaron según sus caracteres morfológicos, siguiendo las claves de identificación presentadas en la Fig. 30, para llegar al diagnóstico específico (Gállego y col., en prensa).

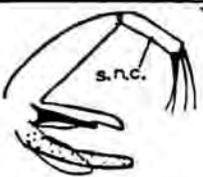
ESPECIES DE <i>Phlebotomidae</i> DE LA PENINSULA IBERICA (IMAGOS ♂)			
GENERO	SUBGENERO	Genitalia externa	ESPECIES
<i>Sergentomyia</i> Estilo con 4 espinas, todas terminales, y 1 seta no caduca (s.n.c.).	<i>Sergentomyia</i> Caracteres del género.		Seta no caduca en límites de tercios medio y distal del estilo. Valvas penianas (v.p.) en dedo de guante.  <i>S. (S.) minuta</i>
<i>Phlebotomus</i> Estilo con 4-5 espinas, solo 2-3 de ellas terminales.	<i>Adlerius</i> Estilo corto; 5 espinas, 2 terminales. Tufo del coxito (t.) sin lóbulo basal. Filamentos genitales 6,5-11x lg. bomba genital.		V. pen. en forma de sable, con punta roma.  <i>P. (A.) mascittii</i>
	<i>Larroussius</i> Estilo corto; 5 espinas, 2 terminales. Tufo de setas del coxito (t.) con éstas implantadas directamente en su región media, sin lóbulo basal. Filamentos genitales 3-5x lg. bomba genital.		V. pen. dilatadas apicalmente, en badajo de campana.  <i>P. (L.) ariasi</i>
			V. pen. finas y alargadas, con extremo agudo, recto o muy ligeramente incurvado.  <i>P. (L.) longicuspis</i>
			V. pen. con extremo bifurcado en dos puntas agudas de longitud desigual.  <i>P. (L.) perniciosus</i>
	<i>Paraphlebotomus</i> Estilo corto y rechoncho, fusiforme, con 4 espinas largas (2 apicales + 2 submedianas). Parámetros (p.) unirráneos. Tufo de setas del coxito en un lóbulo basal (l.b.) bien desarrollado.		Estilo corto (lg.=3xa.); solo 1 espina terminal. L. b. ensanchado apicalmente, con 20-25 setas largas. V. pen. de bordes casi paralelos y punta en proa de canoa.  <i>P. (P.) alexandri</i>
<i>Phlebotomus</i>		Estilo corto (lg.=3xa.); las 2 espinas apicales terminales, con bases a nivel subigual. L. b. largo y estrecho, con 6-10 s. largas. V. pen. con extremo afilado y transparente.  <i>P. (P.) chabaudi</i>	
		Estilo muy corto (lg.=2xa.); solo 1 espina terminal. L.b. largo y estrecho, con 6-20 cortas setas. V. pen. gradualmente atenuadas y en pico de rapaz.  <i>P. (P.) sergenti</i>	
<i>Phlebotomus</i> Estilo largo y delgado, con 5 espinas cortas (3 apicales + 2 submedianas). Parámetros trirrâneos.		Tufo del coxito subapical y con 15 setas + pequeño l.b. con 9 setas cortas y finas. Surestilo con 2 espinas terminales espantuladas. V. pen. en forma de puñal.  <i>P. (P.) papatasi</i>	

Fig. 30

J.C. 190

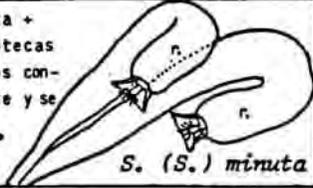
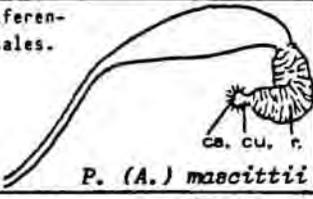
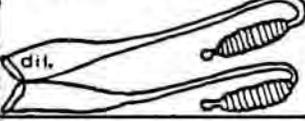
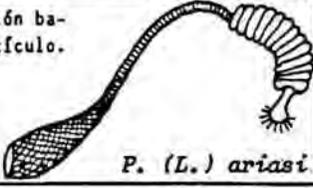
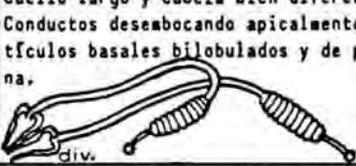
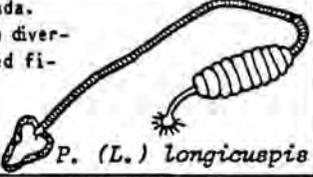
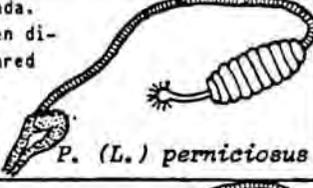
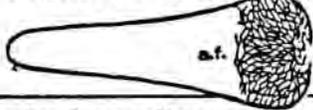
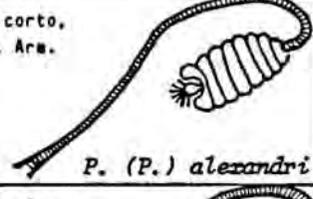
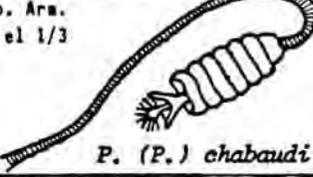
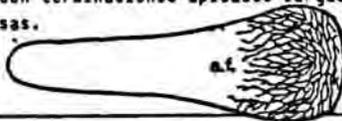
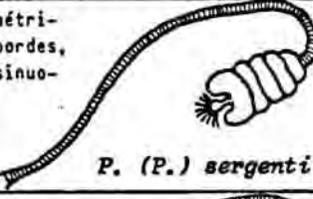
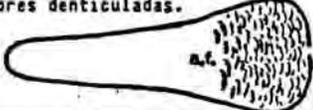
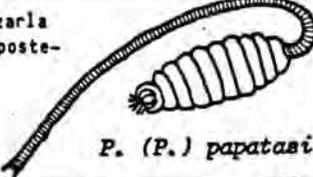
ESPECIES DE <i>Phlebotomidae</i> DE LA PENINSULA IBERICA (IMAGOS ♀)			
GENERO	SUBGENERO	CIBARIO / FARINGE / ESPERMOTECAS	ESPECIES
<p><i>Sergentomyia</i> Cibario armado con dientes (d.). Reservorio (r.) de la espermoteca liso.</p> 	<p><i>Sergentomyia</i> Con los caracteres del género.</p>	<p>60-85 dientes cibariales en fila recta + mancha pigmentaria conspicua. Espermotecas cilindráticas y sin diferenciarse de los conductos, que se atenuan progresivamente y se unen al final.</p> 	 <p><i>S. (S.) minuta</i></p>
<p><i>Phlebotomus</i> Cibario inerme.</p> 	<p><i>Adlerius</i> Conductos no anillados y dilatados en su región próxima al reservorio, no anillado y sí estriado transversalmente.</p>	<p>Cabeza pequeña y cuello (cu.) poco diferenciado. Conductos sin divertículos basales.</p> 	 <p><i>P. (A.) mascittii</i></p>
<p>Reservorio (r.) de la espermoteca con la superficie estriada o anillado y más o menos diferenciado del conducto (cd.); cabeza (cb.) de la espermoteca sesil o pedunculada.</p>	<p><i>Larrousius</i> Reservorios y conductos anillados, los conductos con dilatación no anillada (dil.) o con divertículos (div.) en su base; cabezas pedunculadas.</p>	<p>Cuello corto, poco diferenciado. Región basal del conducto dilatada; sin divertículo.</p> 	 <p><i>P. (L.) ariasi</i></p>
		<p>Cuello largo y cabeza bien diferenciada. Conductos desembocando apicalmente en divertículos basales bilobulados y de pared fina.</p> 	 <p><i>P. (L.) longicauspis</i></p>
		<p>Cuello largo y cabeza bien diferenciada. Conductos desembocando lateralmente en divertículos basales piriformes y de pared gruesa.</p> 	 <p><i>P. (L.) perniciosus</i></p>
	<p><i>Paraphlebotomus</i> Reservorios y conductos anillados, estos últimos sin modificaciones basales; cabezas sesiles; Armadura faríngea con aspecto reticulado.</p>	<p>Anillo distal del reservorio sesil y corto, como un rodete circundando la cabeza. Arm. far. apretada, en el 1/4 basal.</p> 	 <p><i>P. (P.) alexandri</i></p>
		<p>An. distal campaniforme y pedunculado. Arm. far. prolongada por los bordes hasta el 1/3 basal.</p> 	 <p><i>P. (P.) chabaudi</i></p>
		<p>An. distal globuloso y sesil, isodiamétrico. Arm. far. no prolongada por los bordes, con terminaciones apicales largas y sinuosas.</p> 	 <p><i>P. (P.) sergenti</i></p>
	<p><i>Phlebotomus</i> Reserv. y cond. anillados, sin modificaciones basales; cabezas sesiles. Arm. far. escamas en filas transversas.</p>	<p>Cabeza aparentemente grande por abrazarla el an. apical. Escamas far. con las posteriores denticuladas.</p> 	 <p><i>P. (P.) papatasi</i></p>

Fig. 30

JG/90

**RESULTADOS**

## VI.2. RESULTADOS

### VI.2.1. ANALISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS

Se han estudiado 56 estaciones repartidas por toda la comarca del Priorato, recolectándose un total de 809 papeles lo que representa una superficie de 32.36m<sup>2</sup> de papel adhesivo.

El número total de flebotomos capturados ha sido de 4542: 1927 machos, 2577 hembras y 38 ejemplares ginandromorfos (Fisa y col., 1990a), correspondientes a 5 especies distintas (Tabla 35).

SEXO	<u>P.papatasi</u> N°	<u>P.sergenti</u> N°	<u>P.ariasi</u> N°	<u>P.perniciosus</u> N°	<u>S.minuta</u> N°
Machos	6	11	105	668	1137
Hembras	1	1	30	101	2444
Ginandromorfos	0	0	0	0	38
TOTALES	7	12	135	769	3619

Tabla 35. Especies de flebotominos aisladas en la comarca

Nº: número de ejemplares recolectados

En la Tabla 36 se refleja el análisis cuantitativo de las especies halladas, basado en el número de ejemplares aislados (Nº), densidad de flebotomos por m<sup>2</sup> de papel adhesivo (D), abundancia (A) y frecuencia (F), definidas estas dos últimas como:

Abundancia (A): número relativo de ejemplares de una determinada especie de flebotomo respecto al número total de ejemplares de flebotomos recolectados (Vattier Bernard y Trouillet, 1983).

Frecuencia (F): relación entre el número de estaciones donde ha estado presente una especie y el número total de estaciones prospectadas, expresada en porcentaje (Vattier Bernard y Trouillet, 1983).

ESPECIE	Nº	D	A	F
<u>P.papatasi</u>	7	0.2	0.2	7.1
<u>P.sergenti</u>	12	0.4	0.3	14.3
<u>P.ariasi</u>	135	4.2	3.0	62.5
<u>P.perniciosus</u>	769	23.8	16.9	82.1
<u>S.minuta</u>	3619	111.9	79.7	75.0

Tabla 36. Análisis cuantitativo de los flebotominos capturados

Nº: número de ejemplares recolectados  
D: densidad ; A: abundancia ; F: frecuencia

*S.minuta* es la especie de la que se ha aislado el mayor número de ejemplares (3619), y que representa el 79.7% de la colección, con una densidad de 111.9 ejemplares/m<sup>2</sup>. Le sigue *P.perniciosus* (769) con una densidad de 23.8 ejemplares/m<sup>2</sup> y *P.ariasi* (135) con una densidad de 4.2 ejemplares/m<sup>2</sup>. Las dos especies restantes, *P.papatasi* (7) y *P.sergenti* (12), se han aislado con densidades muy bajas, de 0.2 y 0.4 ejemplares/m<sup>2</sup> respectivamente.

Según la clasificación de la O.M.S. 1979 (en Knechtetli, 1989) por índices de densidad, las especies se han clasificado en la comarca como:

-Especies con índice de densidad alta ( $D > 32$ ) :

*S.minuta* (D=111.9)

-Especies con índice de densidad medio ( $8 \geq D < 32$ )

*P.perniciosus* (D=23.8)

-Especies presentes ( $D < 8$ )

*P.ariasii* (D=4.2)

*P.papatasi* (D=0.2)

*P.sergenti* (D=0.4)

Las especies pueden clasificarse, también, según sus valores de frecuencia (F) (Vattier Bernard y Trouillet, 1983) en:

-Especies muy comunes, frecuencia superior al 50%

*S.minuta*

*P.perniciosus*

*P.ariasii*

-Especies raras, frecuencia entre el 10-25%

*P.sergenti*

-Especies muy raras, frecuencia inferior al 10%

*P.papatasi*

VI.2.2. DISTRIBUCION DE LOS FLEBOTOMOS

VI.2.2.1. En las estaciones prospectadas

La distribución geográfica de las especies halladas se indica en la Tabla 37. A partir de estos datos puede observarse la elevada frecuencia con que los flebotominos aparecen en el conjunto de la comarca estudiada, ya que tan solo resultaron totalmente negativas 3 de las 56 estaciones prospectadas.

Est.	(m <sup>2</sup> )	<u>P.papatasi</u>				<u>P.sergenti</u>				<u>P.ariasi</u>				<u>P.perniciosus</u>				<u>S.minuta</u>				
		M	H	T	D	M	H	T	D	M	H	T	D	M	H	T	D	G	M	H	T	D
E-8	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	10	28	3	31	155	0	6	9	15	75.0
E-9	0.86	0	0	0	0	0	0	0	0	11	6	17	19.8	19	3	22	25.6	0	43	62	105	122.1
E-10	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	2	21	35	0	31	39	70	166.7
E-11	1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	2	5	7	7.0
E-12	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	1	41	68.3	0	32	23	55	91.7
E-13	0.64	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	19	29.7	50	1	51	79.7	0	4	12	16	25.0
E-14	0.84	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1.2	1	0	1	1.2	0	1	17	18	21.4
E-15	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	12.5	0	0	0	0	0	0	5	5	31.3
E-16	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8	50.0	0	0	0	0	0
E-17	0.80	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1.3	17	7	24	30.0	31	242	728	1001	1252.5
E-18	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-19	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	11	41	54	207.7
E-20	1.44	0	0	0	0	1	0	1	0.7	0	1	1	0.7	14	4	18	12.5	0	75	165	240	166.7
E-21	1.32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.8	30	4	34	25.8	0	9	22	31	23.5
E-22	0.58	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1.7	13	4	17	29.3	0	7	10	17	29.3
E-23	0.32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3.1	0	29	27	56	175.0
E-24	0.44	0	0	0	0	0	1	1	2.3	0	0	0	0	9	3	12	27.3	0	7	7	14	31.8
E-25	0.84	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	4	4.8	13	2	15	17.9	0	49	56	105	125.0
E-26	0.68	3	1	4	5.9	0	0	0	0	1	2	3	4.4	22	9	31	45.6	0	11	8	19	27.9
E-27	0.52	0	0	0	0	0	0	0	0	10	6	16	30.8	42	8	50	96.2	0	9	16	25	48.1
E-28	0.52	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4	7.7	4	0	4	7.7	0	73	103	176	338.5
E-30	0.64	1	0	1	1.6	1	0	1	1.6	1	1	2	3.1	12	2	14	21.9	0	33	73	106	165.6
E-31	0.28	0	0	0	0	2	0	2	7.1	0	0	0	0	1	0	1	3.6	0	1	2	3	10.7
E-32	0.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	5.6	0	0	2	2	11.1
E-33	0.48	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2.1	2	0	2	4.2	0	0	0	0	0

Est.	(m <sup>2</sup> )	<u>P.papatasi</u>				<u>P.sergenti</u>				<u>P.ariasi</u>				<u>P.perniciosus</u>				<u>S.minuta</u>				
		M	H	T	D	M	H	T	D	M	H	T	D	M	H	T	D	G	M	H	T	D
E-34	0.42	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	7.1	4	1	5	11.9	0	0	0	0	0
E-35	0.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	2	11	50.0	1	14	20	35	159.1
E-36	1.08	1	0	1	0.9	0	0	0	0	4	2	6	5.6	77	10	87	80.6	0	7	35	42	38.9
E-37	0.52	0	0	0	0	1	0	1	1.9	1	0	1	1.9	0	0	0	0	0	1	2	3	5.8
E-38	0.56	0	0	0	0	3	0	3	5.4	1	0	1	1.8	1	0	1	1.8	0	0	8	8	14.3
E-39	0.88	0	0	0	0	0	0	0	0	14	1	15	17.0	4	0	4	4.5	0	10	22	32	36.4
E-40	0.44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4.5	0	8	5	13	29.5
E-41	0.68	0	0	0	0	1	0	1	1.5	1	0	1	1.5	35	3	38	55.9	0	31	97	128	188.2
E-42	1.44	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0.7	24	0	24	16.7	4	25	127	156	108.3
E-43	0.52	1	0	1	1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	22	3	25	48.1	0	10	18	28	53.8
E-44	0.10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	20.0	0	4	7	11	110.0
E-45	0.68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-46	1.18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.8	1	0	1	0.8	0	0	0	0	0
E-47	0.28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3.6	3	2	5	17.9	0	0	0	0	0
E-48	0.56	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	3.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-49	0.58	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	5.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-50	0.86	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	5	5.8	1	0	1	1.2	0	0	0	0	0
E-51	0.52	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	3.8	1	0	1	1.9	0	0	0	0	0
E-52	0.52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3.8	0	0	0	0	0
E-53	0.60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	1	24	40.0	0	11	23	34	56.7
E-54	0.72	0	0	0	0	2	0	2	2.8	3	1	4	5.6	25	8	33	45.8	0	166	269	435	604.2
E-55	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	5.0	0	34	96	130	650.0
E-56	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6	30.0	0	54	122	176	880.0
E-57	0.36	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	5.6	15	0	15	41.7	0	1	14	15	41.7
E-58	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-59	0.80	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-60	0.44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	9.1
E-61	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	4.2	6	0	6	25.0	0	1	2	3	12.5
E-62	1.36	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1	7	5.1	53	13	66	48.5	0	80	135	215	158.1
E-63	0.32	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3.1	3	0	3	9.4	0	3	4	7	21.9
E-64	0.24	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	8.3	5	0	5	20.8	0	2	3	5	20.8
TOTAL	32.36	6	1	7	0.2	11	1	12	0.4	105	30	135	4.2	668	101	769	23.8	38	1137	2444	3619	111.9

Tabla 37 Flebotominos capturados en las estaciones prospectadas en la comarca.

Est: Estación de captura ; m<sup>2</sup> : metros cuadrados de papel estudiado ; M : número de individuos machos recolectados ; H: número de individuos hembras recolectados; T: total de individuos recolectados; D: densidad

En las Figs. 31 y 32 se representa la distribución espacial de las especies consideradas vectoras en el foco: *P. perniciosus* y *P. aiasi*, indicando las densidades halladas en cada una de las estaciones prospectadas.

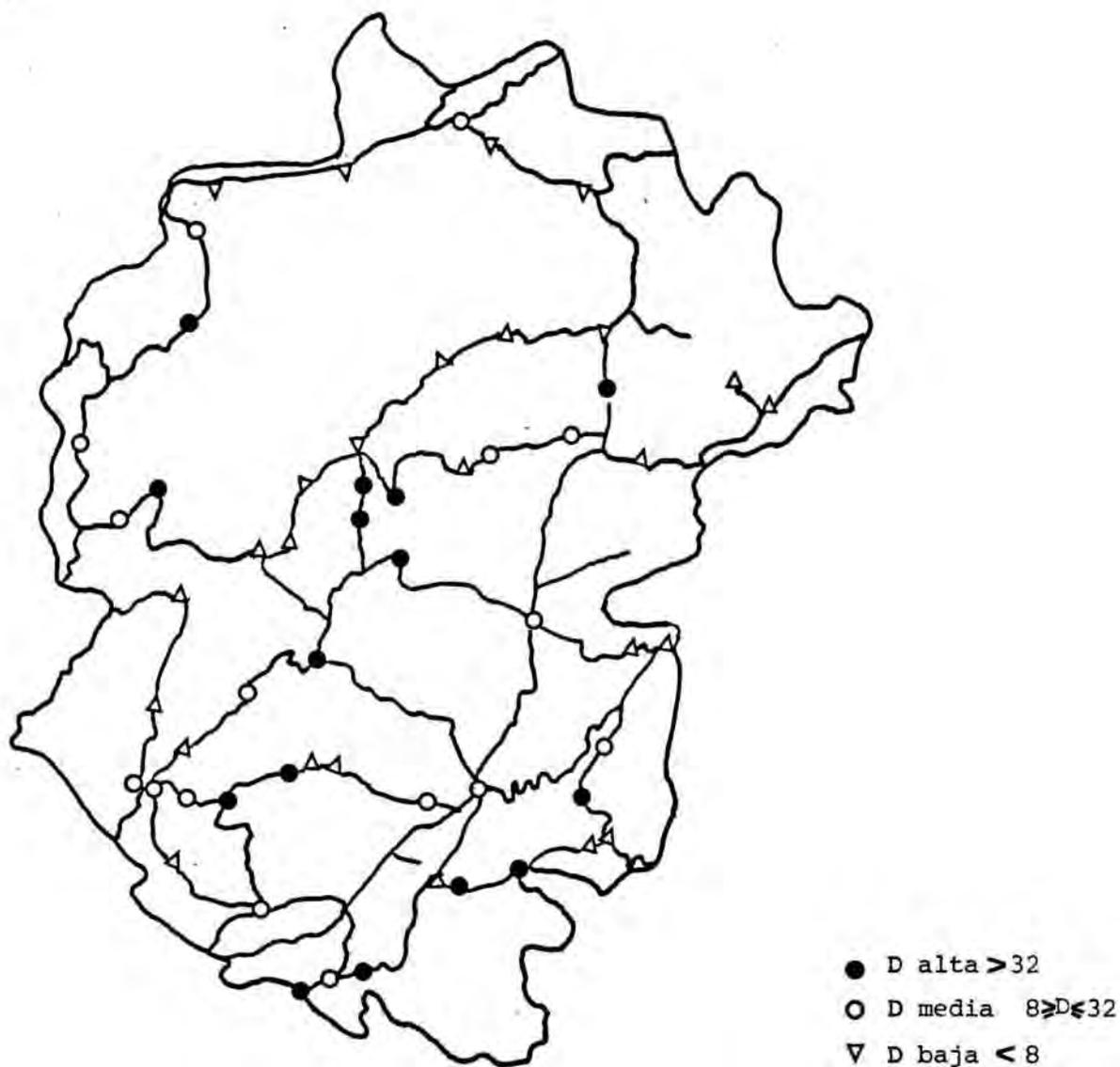


Fig.31 Distribución de *P. perniciosus* en la comarca según las densidades halladas en las estaciones prospectadas.

D: densidad de flebotomos



Fig.32 Distribución de *P. aiasi* en la comarca según las densidades halladas en las estaciones prospectadas.

D: densidad de flebotomos

### VI.2.2.2. Según su proximidad al hábitat humano

Las estaciones muestreadas, teniendo en cuenta la fisonomía de la comarca en estudio, que es eminentemente rural, se han agrupado en: zona habitada, donde se incluyen las estaciones situadas en los núcleos de población, y zona roderal, donde se consideran las estaciones situadas fuera del hábitat humano (Tabla 38).

ZONA	(m <sup>2</sup> )	<u>P.papatasi</u> D	<u>P.sergenti</u> D	<u>P.ariasi</u> D	<u>P.perniciosus</u> D	<u>S.minuta</u> D
Habitada (16.30)		0.2	0.5	2.5	23.3	117.7
Roderal (10.06)		0.2	0.2	5.9	24.3	106.0

Tabla 38. Distribución de los flebotominos según el hábitat

m<sup>2</sup>: metros cuadrados de papel estudiado  
D: densidad

Las casas aisladas eran casi todas deshabitadas por lo que se han englobado dentro del grupo "roderal", exceptuando 4 estaciones (E-16, E-41, E-44 y E-47) que correspondían a una casa habitada y a tres granjas de animales que se han incluido en "zona habitada".

Ninguna de las especies de los flebotominos aislados ha presentado una inclinación especial hacia un hábitat u otro. Por ello no parece que éste pueda considerarse como un factor importante en la distribución espacial de las especies presentes en las estaciones prospectadas.

VI.2.2.3. Distribución por áreas

La distribución de los flebotomos en la comarca se ha estudiado por áreas de 10x10 Km, coincidentes con las anteriormente descritas al realizar el estudio de la leishmaniosis canina (IV.2.8.2., pag. ). Las densidades observadas para cada una de las especies presentes, se indican en la Tabla 39.

AREA	m <sup>2</sup>	<u>P.papatasi</u> D	<u>P.sergenti</u> D	<u>P.ariasi</u> D	<u>P.perniciosus</u> D	<u>S.minuta</u> D
A	2.48	0.4	0.0	0.4	11.3	15.7
B	3.76	0.0	0.0	3.5	2.4	1.1
C	8.14	0.2	0.7	3.8	26.2	68.7
D	6.06	0.0	0.5	2.6	24.0	209.2
E	6.16	0.6	0.5	7.8	33.8	99.4
F	5.76	0.0	0.0	4.5	28.8	197.7

Tabla 39 Distribución de las especies de flebotominos por áreas.  
D: densidad  
m<sup>2</sup>: metros cuadrados de papel estudiado

*P.perniciosus* se halla con densidades elevadas en todas las áreas (24-34 ejemplares/m<sup>2</sup>), exceptuando el área A, donde se observa un descenso importante (11.3 ejemplares/m<sup>2</sup>), y el área B que presenta densidades muy bajas (2.4 ejemplares/m<sup>2</sup>).

*P.ariasi* sigue una distribución más uniforme, sin embargo su captura ha proporcionado densidades bajas en todas las áreas.

Respecto a las demás especies halladas, consideradas no implicadas en la transmisión de la parasitosis, destaca el

comportamiento de *S.minuta*, quien se halla con densidades muy elevadas en las áreas C, D, E y F (69-209 ejemplares/m<sup>2</sup>) y con una densidad mucho más baja en el área A, que pasa a ser muy pequeña en el área B.

#### VI.2.2.4. Por altitudes

La comarca del Priorat presenta una notable variación altitudinal. Las estaciones muestreadas oscilan entre altitudes de 100m hasta 800m, con una sola estación que ha superado esta altitud (E-49, 809m). Para conocer la influencia de la altura en la distribución de las especies de flebotominos presentes, se ha estratificado la zona de estudio en niveles de 100 metros, incluyéndose la estación E-49 en el último estrato entre 701-800m (Tabla 40).

ALTITUD (m)	m <sup>2</sup>	<u>P.papatasi</u> D	<u>P.sergenti</u> D	<u>P.ariasii</u> D	<u>P.perniciosus</u> D	<u>S.minuta</u> D
100-200	3.68	1.1	0.3	11.7	42.4	112.2
201-300	4.88	0.2	1.0	5.1	32.4	77.7
301-400	12.66	0.2	0.4	2.1	28.2	85.9
401-500	3.76	0.0	0.5	5.9	22.9	462.2
501-600	1.86	0.0	0.0	3.7	4.3	0.0
601-700	2.00	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0
701-800	3.52	0.0	0.0	1.9	0.6	1.1

Tabla 40 Distribución de la población de flebotominos según los niveles altitudinales.

D: densidad ; m: altitud en metros  
m<sup>2</sup>: metros cuadrados de papel estudiado

Se observa (Fig. 33), por lo tanto, una relación negativa entre altitud y densidad de *P.perniciosus*, que aparece con densidades elevadas entre 100-500 m , descendiendo bruscamente a alturas superiores.

*P.ariasi* se halla con densidades similares en los distintos niveles altitudinales, siendo algo más abundante a bajas altitudes, entre 100-200m. Las bajas densidades detectadas no permiten observar claramente la influencia de la altitud (Fig. 34).

*S.minuta* se comporta como una especie muy influenciada por la altitud, ya que se observa que las altas densidades detectadas a bajas altitudes (78-462 ejemplares/m<sup>2</sup>) llegan casi a desaparecer al superar los 500m de altitud (Tabla 40).

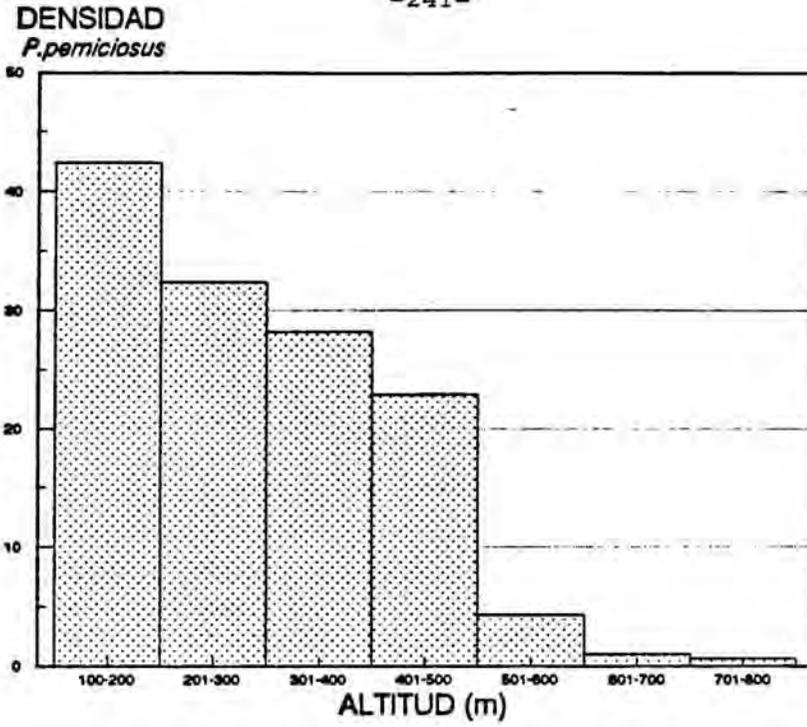


Fig. 33 Densidad *P. perniciosus* detectadas en los distintos estratos altitudinales muestreados

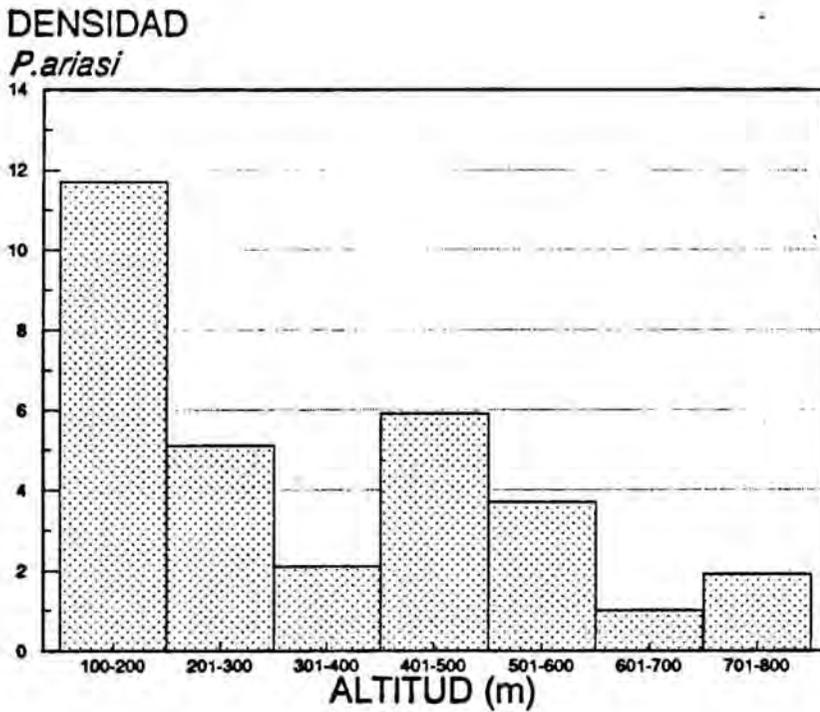


Fig. 34 Densidad *P. ariasi* detectada en los distintos estratos altitudinales muestreados

DISCUSSION

### VI.3. DISCUSION

#### VI.3.1 ANALISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS

La riqueza específica hallada en la zona de estudio es de 5 especies: *P.papatasi*, *P.sergenti*, *P.ariasii*, *P.perniciosus* y *S.minuta*, frente a las 9 especies halladas en la Península Ibérica (*P.longicuspis*, *P.chabaudi* y *P.alexandri* en el SO, y *P.mascitti* en el N) (Gil Collado y col., 1989; Gállego y col., en prensa). Las 5 especies capturadas están ampliamente difundidas por toda la Península, donde *P.sergenti* y *P.papatasi* se comportan como especies escasas, al igual que ocurre en nuestra zona de estudio.

Por el análisis cuantitativo de las especies capturadas (Tabla 36), mediante el sistema de los papeles adhesivos, se observa que las especies que predominan son *S.minuta* y *P.perniciosus*, siendo la densidad hallada de *P.ariasii* mucho menor. Por otro lado, la frecuencia calculada indica que las tres especies *S.minuta*, *P.perniciosus* y *P.ariasii* se encuentran ampliamente distribuidas por toda la zona. Estos resultados concuerdan con los hallados por diversos autores en otras zonas españolas próximas (Lucientes, 1986; Corachan y col., 1987; Sánchez Acedo y col., 1987; Botet y col., 1989; Mezquida, 1990; Rovira, 1990; Gállego y col., 1990).

*S.minuta* es una especie estrictamente herpetófila, por lo que se descarta como vector de la leishmaniosis (Rioux y col., 1967). *P.perniciosus* y *P.ariasii* son especies zooantroponofilas, con marcada cinofilia cuya capacidad vectorial ha sido probada en distintos focos del Mediterráneo (Rioux y col., 1973; Pires, 1984; Killick-Kendrick y Rioux, 1981; Bettini y col., 1986b; Lucientes y col., 1988; Maroli y col., 1988; Sanchís Marín y col., 1991) y asimismo en nuestro propio foco en estudio (Rioux y col., 1986a; Moreno, 1989), como así lo indican los trabajos realizados por Rioux y col. en dos

poblaciones del Priorato (Torroja y Poboleda) (Tabla 41).

<u>N°♀♀ positivas</u> <u>N°♀♀ disecadas</u>	<u>P.perniciosus</u>	<u>P.ariasii</u>	<u>Total</u>
Torroja	6/1415	7/1088	13/2503
Poboleda	1/2100	4/122	5/2222
Total	7/3515	11/1210	18/4725

Tabla 41. Infestación natural en P.perniciosus y P.ariasii en dos poblaciones del Priorato (Moreno, 1989).

En el presente estudio, el bajo número de ejemplares capturados de P.ariasii podría poner en duda su papel vectorial, sin embargo parece que el método de captura utilizado ha sesgado en gran medida los resultados. Estudios, puntuales anteriores, realizados en la población de Torroja con trampas luminosas dieron resultados muy distintos (Rioux, J.A., com. pers.), con una relación entre los dos especies capturadas de 1.64, como se observa la Tabla 42.

	<u>P.perniciosus</u> <u>N°</u>	<u>P.ariasii</u> <u>N°</u>
♂♂	1551	719
♀♀	2015	1462
Total	3566	2181

Tabla 42. Capturas realizadas en la población de Torroja del Priorato con cepos luminosos (Rioux, J.A., com pers.).

Ello puede ser debido al importante fototropismo que presenta *P.ariasi* (Rioux y col., 1968b; Martínez Ortega y col., 1982; Botet, 1991a) que aumentaría el número de capturas al utilizar trampas luminosas, y también al hecho de que los puntos muestreados con papeles no coincidan con los sitios de reposo ni con el hábitat de estos flebotomos (Dolmatova y Demina, 1971). Esta opinión viene reforzada por los trabajos de Seguí y Botet quienes obtienen resultados muy dispares al comparar los dos sistemas de captura en un mismo lugar (Botet, 1991a; Seguí, 1991). Según Botet (1991a) los papeles adhesivos seleccionan *S.minuta* y en menor medida machos de *P.perniciosus*, y los cepos luminosos capturan fundamentalmente *P.ariasi*, a causa de su mayor fototropismo.

En cuanto a la repartición por sexos, teniendo en cuenta que se utiliza el sistema de captura de los papeles adhesivos, aparece en todas las especies halladas, excepto en *S.minuta*, un mayor porcentaje de machos que de hembras, lo que coincide con los resultados expuestos por otros autores (Rioux y col., 1972b, Mezquida, 1990; Rovira, 1990; Botet, 1991a). El relativo alto número de ejemplares machos de *P.perniciosus* en los agujeros de los muros, que son lugares mayoritariamente muestreados por ser los más asequibles, sugiere que éstos constituyen auténticos lugares de reposo diurno para ellos (Maroli y col., 1987; Botet, 1991a). El bajo número de ejemplares de *P.ariasi* recolectados parece indicar que los muros no constituyen su hábitat ni su refugio (Botet, 1991a).

Respecto *S.minuta*, especie claramente herpetófila, las proporciones halladas oscilan dependiendo del hábitat que posean las especies de reptiles sobre las cuales se alimentan (Botet y col., 1991b). En nuestro caso se ha obtenido un elevado porcentaje de hembras, 68%, lo que sugiere que los mechinales, además de ser sus lugares de reposo, son también sus lugares de reproducción y alimentación, donde *S.minuta* cumple todo su ciclo biológico casi en exclusividad (Rioux

y col., 1967; Croset y col., 1978; Maroli y col., 1987). Nuestros porcentajes son semejantes a los citados por otros autores (Rioux y col., 1968b; Encinas Grande y col., 1988; Botet, 1991a).

Es de destacar el hallazgo en *S.minuta* de 38 individuos ginandromorfos detectados, la mayoría de ellos, en una sola estación de captura (31 ejemplares en la estación E-17 y los 7 restantes repartidos en las estaciones E-19, E-35 y E-42) (Fisa y col., 1990a, Gállego y col., 1991), lo que representa el mayor número de ginandromorfos citados en la literatura (Parrot y Habbibi, 1946; Sherlock, 1958; Rioux y col., 1965; Rioux y col., 1974; Ashford, 1974; Vattier Bernard, 1975; Addadi y Dedet, 1977; Leger y col., 1982; Morillas y col., 1983b; Geoffrey, 1984; Lucientes Curdi, 1986; Martínez Ortega y col., 1989a). La importancia del hallazgo de esta población de ginandromorfos aislada ha motivado el inicio de un estudio encaminado a determinar las causas que pueden inducir la aparición de estas teratologías.

### VI.3.2. DISTRIBUCION DE LOS FLEBOTOMOS EN EL ESPACIO

La frecuencia con que aparecen los flebotomos en las estaciones prospectadas en la comarca (VI.2.2.1, pag.233) es muy elevada, 94.6%, apareciendo las especies consideradas vectoras de *Leishmania* con frecuencias del 82.1% (*P.perniciosus*) y 62.5% (*P.ariasi*).

La proximidad o lejanía de las estaciones a los núcleos urbanos, "zonas habitadas", no parece influir en la distribución de los flebotomos (Tabla 38, pag.237). Debe indicarse que la comarca es eminentemente rural, con poblaciones generalmente pequeñas, donde han sido muestreados los exteriores de las viviendas. Los estudios realizados en grandes ciudades conducen a resultados muy distintos, ya que

los flebotomos están ausentes en la parte central plenamente urbanizada, apareciendo en la periferia y alrededores (Adler y Theodor, 1931; Sánchez Acedo y col., 1987).

Sin embargo, su distribución en la comarca es heterogénea (Tabla 39, pag. ), de tal modo que puede diferenciarse entre la parte central y sur de la comarca (Area C, D, E y F) donde *P. perniciosus* aparece con densidades elevadas y la parte norte (Area A y B) donde las densidades detectadas son mucho menores. Por contra, *P. ariasi* presenta una distribución más uniforme en todas las áreas.

Destaca la influencia importante de la altitud, observada en toda la zona de estudio (Tabla 40, pag.239). Ello concuerda con la idea clásica que considera la latitud y la altitud, como los factores limitantes de la distribución de las especies (Lewis, 1971):

*P. perniciosus* se encuentra con densidades medias y altas en la zona comprendida entre 100-500 m, detectándose un brusco descenso a altitudes mayores (Fig. 33). Ello coincide con las apreciaciones de diversos autores en zonas de nuestra latitud (Rioux y col., 1970; Martínez Ortega, 1986; Encinas Grande y col., 1988, Gállego y col., 1990), considerando que se trata de una especie propia de climas semi-áridos. En el SE de España se encuentra en un rango más amplio, desde 0 a 1430 m, aunque se presenta con mayor abundancia entre 20-400 m (Martínez Ortega y Conesa Gallego, 1989b).

*P. ariasi* se distribuye con más uniformidad en las distintas altitudes muestreadas, aunque siempre con densidades bajas (Fig. 34, pag.241). Esta especie se ha descrito como una especie capaz de ubicarse en un amplio rango altitudinal y con tendencia a habitar zonas húmedas y frías. Se considera que puede llegar a altitudes elevadas

por encima de los 1000 m, como se ha descrito en Cevennes (Rioux y col., 1970; Killick-Kendrick y Rioux, 1981), en los Pirineos Aragoneses (Lucientes Curdi y col., 1989) o en el SE de la Península Ibérica (Martínez Ortega y Conesa Gallego, 1989b), aunque las densidades máximas se obtienen a distintas altitudes según las zonas: entre 300-600 m en Cevennes (Rioux y col., 1970), >1000m altitud en la provincia de Lérida (Gállego y col., 1990), >600m altitud en Salamanca (Encinas Grande y col., 1988) o entre 800-1300 m en el SE de la Península Ibérica (Martínez ortega y Conesa Gallego, 1989b). De todos modos el no constituir los papeles adhesivos un método idóneo para la captura de esta especie (Botet y col., 1991b), junto al distinto comportamiento exo-endofílico que presentan las cepas de *P. irasi* (KK en Cevenes) dificulta la evaluación de la densidad real de esta especie.

Al considerar la fisiografía de la comarca se observa que la zona central y sur del Priorato (Area C, D, E y F) se sitúa entre 100-500 m, por lo que se trata de la zona donde las densidades halladas de los flebotomos vectores son elevadas. Por contra, la zona norte del Priorato (Area A y B) se sitúa, en su mayor parte, a altitudes superiores, donde las densidades de los flebotomos vectores son bajas, lo que coincide plenamente con los resultados expuestos anteriormente.

VII. D I S C U S I O N G E N E R A L

## VII. DISCUSION GENERAL

El foco de leishmaniosis localizado en la comarca del Priorato (Tarragona) es un foco eminentemente rural con particularidades propias: plurivectorialidad introfocal y coexistencia de diversos zimodemas en condiciones simpátricas e incluso sintópicas. El hombre se introduce en el ciclo epidemiológico de modo accidental, si bien tanto la forma visceral como la cutánea, más frecuentemente esta última, son conocidas desde antiguo en la zona (Frias Roig, 1914; Frias Roig, 1918; Fullat Aragones, 1927).

El perro, considerado el reservorio principal, se halla parasitado con tasas importantes de prevalencia (10.2% de prevalencia media en la comarca), detectándose una incidencia anual del 5.7%, comparable a los datos expuestos por otros autores en otros focos del Mediterráneo igualmente activos (Morillas Márquez y col., 1989; Dunan y col., 1989).

La elevada prevalencia de animales con leishmaniosis y la evolución crónica de la enfermedad explican el mantenimiento de la enzootía en el foco. Estudios longitudinales realizados sobre estos animales leishmaniósicos han permitido observar dos tipos de comportamiento : una evolución de tipo crónico (65%), que lleva al animal a un empeoramiento clínico paulatino desde el llamado estado asintomático hasta el estado sintomático y por último a la muerte en el período de varios años, o bien una evolución rápida, de tipo agudo, que lleva al animal asintomático a fallecer en un período de tiempo inferior al año (35%). La existencia de leishmaniosis regresivas ha podido también ser puesta de manifiesto en un 15% de los animales diagnosticados serológicamente y/o por visualización directa del parásito.

El elevado porcentaje de animales leishmaniósicos, hallados en el foco, que no manifiestan clínicamente la enfermedad (65% de animales asintomáticos u oligosintomáticos) representa un reservorio silente de la parasitosis, muy difícil de detectar fuera de las campañas epidemiológicas a gran escala. Por ello es de destacar su importante papel epidemiológico, más aún cuando su capacidad real de infestar al flebotomo vector no es del todo conocida y en la actualidad objeto de controversia. Autores como Rioux y col. (1972a) y Gradoni y col. (1987b) estiman que la capacidad infestante del perro sin sintomatología clínica es muy reducida. Sin embargo, otros autores consideran que el animal asintomático posee un importante poder infectivo (Alvar, J. com. pers.). En este sentido Sánchez Botija, ya en 1936, denunció la presencia de *Leishmania* en la piel aparentemente sana de perros asintomáticos.

La búsqueda de otros reservorios, centrada fundamentalmente en los roedores, no ha dado resultados positivos, si exceptuamos la seropositividad hallada en ratones de campo (7/69 *Mus spretus* y 1/28 *A.sylvaticus*), cuyo significado resta poco claro. Por otro lado, los zorros varias veces incriminados en otros focos del Mediterráneo como posible reservorio salvaje, muestran en nuestro foco títulos bajos de anticuerpos anti-*Leishmania* en 7/16 casos estudiados, lo que es importante de resaltar. El zorro se ha hallado parasitado en otros focos en porcentajes que oscilan entre 2-6% (Rioux y col., 1968a; Bettini y col., 1980; Marín Iniesta y col., 1982; Abranches y col., 1984), por lo que suponiendo que se comporte de modo semejante en nuestro foco es lógico que no haya podido hallarse ningún animal positivo, dado el bajo número de ejemplares estudiados. No obstante, los títulos serológicos detectados son indicativos de su posible papel,

considerando que el zorro se comporte y responda inmunologicamente como el perro, quien en esta comarca presenta en un 40% de los casos títulos serológicos bajos.

Por ello no puede olvidarse la posibilidad de que nuestro foco no corresponda exactamente a un foco de tipo Secundario, sino más bien a un foco Primo-Secundario de Garnham (1965), donde el papel de estos animales debería estudiarse en profundidad y cuya complejidad dificultaría, en mayor grado, las medidas profilácticas, de control y de erradicación de la enfermedad.

Los aislamientos de cepas de *Leishmania* realizados han permitido observar la coexistencia de tres zimodemas circulantes en el foco: MON-1, MON-29 y MON-77, y un cuarto zimodema (MON-105) aislado posteriormente en el Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier, en un perro importado de la población de Torroja del Priorat. En la cuenca mediterránea han sido también citados otros focos donde también el agente etiológico es heterogéneo, como son la zona italiana de Monte Argentario (Gramiccia y col., 1986), o los Pirineos Orientales franceses (Rioux y col., 1985).

MON-1, MON-77 y MON-105 son tres zimodemas muy próximos que tan solo difieren entre sí en un isoenzima, G6PD. MON-1 y MON-105 representarían los homocigotos en este locus y MON-77 llevaría el fenotipo heterocigoto. MON-1 corresponde a un zimodema dermo-viscerotropo aislado repetidas veces en la zona mediterránea, tanto en el hombre como en el perro. MON-77, aislado exclusivamente en el perro, aparece como un zimodema nuevo, no aislado en ningún otro foco de la zona y en cambio muy frecuente en el Priorat, con carácter dermo-viscerotropo en el perro. MON-105, aislado en un perro del Priorato y en flebotomos alimentados sobre este animal,

aparece también como un nuevo zimodema. La presencia de estos zimodemas tan próximos apoyan la hipótesis de que puedan existir procesos de intercambio genético entre las leishmanias.

MON-29, además de separarse por el isoenzima G6PD, difiere asimismo del zimodema MON-1 en otros dos isoenzimas (MDH y NP). En el foco ha sido aislado únicamente en el vector, tanto de *P. perniciosus* como de *P. ariasi*, y no ha podido ser aislado en el reservorio canino ni en los demás animales estudiados, por lo que su reservorio queda por dilucidar. MON-29 es un zimodema aislado en otros focos del Mediterráneo como causante de leishmaniosis cutáneas humanas, aunque se ha citado en un caso de leishmaniosis mucocutánea (Alvar, 1988) y visceral (Jiménez y col., 1991) en pacientes en estado de anergia inmunitaria.

Entre las distintas hipótesis que pueden explicar la frecuencia con que este zimodema (MON-29) aparece en el vector (10 de 13 cepas de *Leishmania* aisladas en la población de Torroja y 2 de 5 aisladas en Poboleda) y su no detección en el reservorio citaremos:

- a) La posibilidad de que también en el reservorio (canino u otro) MON-29 tenga carácter dermatropo. No se habría detectado dado el bajo número de biopsias realizadas. Es posible además que su patogenicidad sea escasa y que de lugar a lesiones muy ligeras o inaparentes, lo que dificultaría todavía más su localización. Debe destacarse la observación realizada por Sánchez Botija ya en 1936 de la presencia de leishmanias en el perro en piel sana.
- b) Es posible también que MON-29 tenga otro u otros reservorios. De los estudios serológicos realizados *M. spretus* podría ser un candidato, aún cuando los datos

aportados por otros autores no apoyan esta hipótesis (Rioux y col., 1968a).

- c) No puede tampoco descartarse, aún cuando consideramos poco probable, la posibilidad de que MON-29 sea una cepa de carácter antroponótico. Es difícil, no obstante, explicar el mantenimiento del ciclo a través de únicamente formas humanas, dada su baja frecuencia.

Para intentar delimitar el foco y conocer su estructura se ha estudiado la distribución de las especies vectoras, considerada como el verdadero factor limitante de la distribución y dispersión de la leishmaniosis (Safjanova, 1977). Tanto *P. perniciosus* como *P. ariasi* son reconocidos como las especies vectoras en el foco, ya que han podido realizarse diversos aislamientos de cepas de *Leishmania* (MON-1, MON-29, MON-77) en condiciones naturales y las dos especies se encuentran ampliamente distribuidas por toda la geografía de la comarca. El bajo número de *P. ariasi* recolectados, creemos que es debido en gran medida al método de captura utilizado (trampas adhesivas), ya que estudios puntuales con cepos luminosos han arrojado proporciones mucho más elevadas de este flebotomo, aunque menores a las halladas para *P. perniciosus*.

En los focos mediterráneos, donde se considera que los principales responsables del mantenimiento de la parasitosis son el reservorio canino y el flebotomo vector, a pesar del hallazgo de otros animales parasitados (Rioux y col., 1977), se han propuesto diversos modelos matemáticos para representar su interrelación (Rioux y col., 1977; Jolivet y col., 1977; Dye, 1988). Se acepta que existe un nivel mínimo de flebotomos por debajo del cual la transmisión de la enfermedad no puede producirse.

En nuestro foco, al relacionar la distribución y densidad de las especies vectoras con la distribución de la leishmaniasis canina, se observa un estrecho vínculo, que es muy marcado, en el caso de *P. perniciosus* y mucho más difícil de valorar en *P. aiasi*, debido al bajo número de ejemplares recolectados (Tabla 43).

AREA	Leishmaniosis canina		Flebotomos vectores	
	P (%)	TGM	<i>P. perniciosus</i> (D)	<i>P. aiasi</i> (D)
A	0	5.6	12.9	0.4
B	5.1	7.4	2.0	2.9
C	9.3	16.1	27.9	4.1
D	16.9	28.0	27.6	2.9
E	10.2	21.6	33.9	7.8
F	8.1	11.9	28.8	4.5

Tabla 43. Leishmaniosis canina y sus vectores según las distintas áreas descritas (100Km<sup>2</sup>).

P: Prevalencia; TGM: media geométrica de la inversa de los títulos serológicos; D: densidad

Es de remarcar la notable influencia de la altitud sobre la densidad de los flebotomos, fundamentalmente sobre *P. perniciosus*, que se correlaciona estrechamente con la tasa de prevalencia de la parasitosis (Tabla 44, Fig. 35).

Se observa que las densidades máximas de los vectores implicados se detectan entre 200-500 m de altitud, que corresponde a la zona definida como de alta endemia canina, por lo que se considera como la zona de "máximo riesgo epidemiológico". Esta zona se sitúa en el Bajo Priorato y en el Priorato Geológico (Areas C, D, E y F), separada por el macizo del Montsant de la zona considerada de baja endemia, el Alto Priorato (Areas A y B), que en su mayor parte se encuentra a altitudes superiores a 500 m. y goza de unas condiciones climáticas más severas debido a las influencias que llegan de la comarca de Les Garrigues, de tipo continental estépico, y a las del propio macizo del Montsant.

ALTITUD (m)	Leishmaniosis canina		Flebotomos vectores	
	P (%)	TGM	<i>P. perniciosus</i> (D)	<i>P. aiasi</i> (D)
200-300	11.9	28.8	32.4	5.1
301-400	9.8	12.9	28.2	2.1
401-500	17.6	31.7	22.9	5.9
501-600	7.4	7.6	4.3	3.7
601-700	0.0	17.8	1.0	1.0
701-800	3.2	2.7	0.6	1.9

Tabla 44. Leishmaniosis canina y sus vectores según los distintos niveles altitudinales.

P: Prevalencia media; TGM: media geométrica de la inversa de los títulos serológicos; D: Densidad

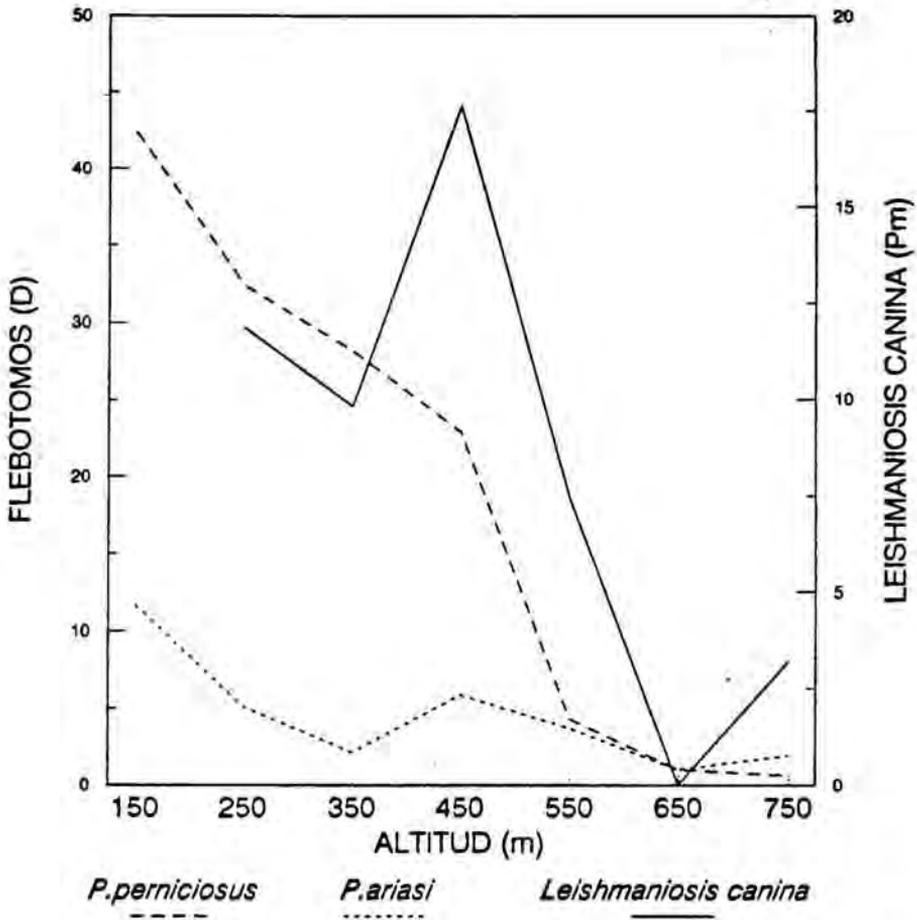


Fig. 35 Leishmaniosis canina y sus vectores según los distintos niveles altitudinales

El Priorat es una comarca de fisiografía muy característica, constituido por una depresión central y una serie de montañas periféricas que lo conforman, que queda abierta tan solo al oeste hacia la comarca de la Ribera d'Ebre. Ello lo convierte en un foco, que al igual que la depresión central que lo configura, queda abierto tan solo hacia la comarca de la Ribera d'Ebre, lo que se intuye al observar las elevadas prevalencias de leishmaniosis en las poblaciones limítrofes con esta comarca (Els Guiamets, El Molar, El Masroig, etc.) y que se comportan como puntos de alta endemia. Por otro lado, estudios de prevalencia de la leishmaniosis canina realizados en la comarca del Baix Camp, con la que limita al este, muestran porcentajes bajos (Pm: 2%) (Portús y col., 1987a), lo que podría indicar que las montañas que separan ambas comarcas (Sierra de LLavanera y Sierra de Tivissa) se comportan como verdaderas barreras naturales.

VIII. CONCLUSIONES

## VIII. CONCLUSIONES

### Consideraciones previas

El estudio de un foco leishmaniósico debe ser el estudio integrado de todos los elementos implicados en el ciclo (el parásito, el reservorio y el vector), y su entorno geográfico.

Es por ello que los resultados obtenidos del trabajo realizado y aquí expuesto no pueden independizarse de los conocimientos ya existentes sobre el foco, y que sirvieron de base para un estudio más profundo, así como de aquellos otros fruto del trabajo de otros investigadores, fundamentalmente del equipo del Prof. Rioux de Montpellier con quien colaboramos en el marco de proyectos conjuntos.

La obligada limitación material y temporal que comporta la realización de una tesis doctoral nos indujo a centrar nuestros esfuerzos fundamentalmente hacia el reservorio. De los otros dos elementos del ciclo, el parásito es objeto de estudio intensivo en el Laboratoire d'Ecologie Medicale de Montpellier, donde se han realizado todos los tipajes isoenzimáticos de las cepas aisladas. El estudio del vector, y fruto de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, es objeto de profundización en la actualidad en nuestro Laboratorio.

Del trabajo realizado en el foco leishmaniósico del Priorat hemos extraído las siguientes conclusiones:

#### -Sobre el parásito

1. En el foco se conoce la existencia de 4 zimodemas de *Leishmania infantum*: MON-1, MON-29, MON-77 y MON-105. En el

reservorio canino han podido aislarse tres de ellos: MON-1, MON-77 y MON-105, los cuales difieren entre si, por un sólo sistema enzimático (G6PD) de los trece analizados. MON-29, repetidamente incriminado en el foco catalán como causante de leishmaniosis cutánea humana, tan sólo se ha aislado del vector, *P. perniciosus* y *P. ariasi*.

### -Sobre el reservorio habitual

2. Para conocer el alcance de la endemia canina se ha utilizado como método de cribado la técnica serológica "Dot-ELISA"-Proteína A, que se ha revelado como una técnica sensible y específica al aceptar como umbral de positividad el título 1/800.
3. La seroprevalencia detectada en el conjunto de la comarca se ha situado en un 10.2%, con una incidencia anual del 5.7%. Según las prevalencias halladas pueden diferenciarse dos grandes zonas geográficamente bien delimitadas:
  - zona de alta endemia canina (Pm: 11.9%) situada en el Bajo Priorat y Priorat Histórico (100-500m altitud).
  - zona de baja endemia canina (Pm: 4.5%), situada en el Alto Priorat, separada del resto por el macizo del Montsant (300-800m altitud).
4. Destaca el elevado número de animales seropositivos con títulos 1/100-1/400 que no llegan a alcanzar el umbral de positividad aceptado (1/800). Estos animales representan el 40% del conjunto analizado en la comarca, al lado de tan solo el 40.8% de animales seronegativos.

5. Los animales considerados afectados de leishmaniosis (título serológico  $\geq 1/800$  y/o cultivo positivo) han presentado sintomatología dispar. Tan solo un 35.3% presentaban signos sugestivos de una leishmaniosis por lo que han sido considerados como "sintomáticos", frente a un 34.6% de animales "oligosintomáticos" y un 30.1% de animales "asintomáticos".
  
6. Los estudios longitudinales, clínicos y serológicos, realizados entre los animales que han superado el umbral de positividad ha permitido observar una evolución negativa en el 85% de los animales y una regresión de la enfermedad, detectada en la clínica y la serología, en el 15% restante.

Entre los animales que evolucionan negativamente se ha observado dos tendencias:

- 1 Evolución clínica aguda, detectada en el 35% de los perros, que conduce a la muerte en un período inferior al año.
  
  - 2 Evolución crónica, detectada en el 65% restante, que comporta el empeoramiento paulatino del estado general del animal en un período de varios años.
- 
7. Los estudios longitudinales realizados entre animales con títulos serológicos bajos que no alcanzan el umbral de positividad indican:
    - a) que en un 10-20% representan la fase pre-patente de la enfermedad, que se manifiesta con un incremento de la tasa de anticuerpos.

b) que en el 80-90% de los casos restantes las serologías se mantienen invariables. Consideramos que en estos casos podría tratarse tanto de títulos de recuerdo de leishmaniosis autolimitadas como de la respuesta humoral a repetidas inoculaciones del parásito, por parte del vector, que no lograron establecerse.

8. Las características de los animales (edad, sexo, pelo, peso y actividad) han sido valoradas. Entre ellos tan solo la edad y el sexo parecen influir. Se ha observado un aumento paulatino de la prevalencia con la edad y también un mayor porcentaje de machos afectos, aunque tan solo entre los animales adultos, donde factores como son la gestación y el parto podrían influir.

#### -Sobre la búsqueda de otros posibles reservorios

9. Entre los micromamíferos estudiados ningún ejemplar ha sido hallado parasitado, si bien se ha detectado positividad serológica en ejemplares de *Mus spretus* y *Apodemus sylvaticus*.

10. Los estudios serológicos efectuados en cabras y ovejas han dado resultados negativos.

11. Un 40% de los zorros analizados han presentado tasas bajas de anticuerpos. Sin embargo, el bajo número de animales analizados y la inadecuación de la muestra obtenida para la realización del examen directo o cultivo no permite definirnos sobre su posible papel como reservorio.

-Sobre el vector

12. Los flebotomos presentes en la comarca son: *P. papatasi*, *P. sergenti*, *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. ariasi* y *S. minuta*.
13. *P. perniciosus* y *P. ariasi*, consideradas las especies vectoras en el foco, se hallan con frecuencia elevada en el conjunto de las estaciones prospectadas (82.1% y 62.5%, respectivamente).
14. *P. perniciosus* presenta densidades elevadas en las estaciones situadas entre 100-500m, que corresponde principalmente al Bajo Priorat y Priorat Histórico (24-34 ejemplares/m<sup>2</sup>), lo que coincide con la zona de alta endemia de leishmaniosis canina. En el Alto Priorat las densidades halladas han sido muy inferiores (2-12 ejemplares/m<sup>2</sup>).
15. *P. ariasi* se ha hallado con densidades poco importantes en todas las zonas estudiadas (0.4-8 ejemplares/m<sup>2</sup>), sin que se observe una influencia notable de la altitud en su distribución. Sin embargo, estos resultados están, sin duda, sesgados como consecuencia del método de captura utilizado.

-Sobre los límites geográficos del foco

16. El foco queda limitado por las propias barreras naturales que conforman la comarca: al norte el macizo del Montsant y al este las sierras de LLavanera y de Tivissa, que lo separan de la comarca del Baix Camp. Sin embargo, queda abierto por el oeste, hacia la comarca de la Ribera d'Ebre.

IX. BIBLIOGRAFIA

ABRANCHES, P.; CONCEIÇÃO SILVA, F.M.; RIBEIRO, M.M.S.; LOPES, F.J. Y GOMES, L.T. (1983a). Kala-azar in Portugal. IV. The wild reservoir: the isolates of a *Leishmania* from a fox. (correspondance). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77 (3): 420-421.

ABRANCHES, P.; CONCEIÇÃO SILVA, F.M. Y SILVA PEREIRA, M.C.P. (1984). Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *J. Trop. Med. Hyg.* 87 (5): 197-200.

ABRANCHES, P. CONCEIÇÃO SILVA, F.M. Y SILVA PEREIRA, M.C.D. (1986). Le foyer de leishmaniose viscerale de la region de Lisbonne. Application du typage enzymatique des souches isolées à l'interpretation de sa structure. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogenèse. Applications éco-épidémiologiques.* Rioux, J.A., eds. IMEEE, Montpellier: 69.

ABRANCHES, P.; LOPES, F.J.; SILVA, F.M.C.; RIBEIRO, M.M.S. Y PIRES, C. A. (1983b). 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. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58 (4): 307-315.

ABRANCHES, P.; SAMPAIO SILVA, M.L.; SANTOS GOMES, G.M.; AVELINO, I.C.; PIRES, C.A.; CONCEIÇÃO SILVA, F.M.; SEIXAS LOPES, A.; SILVA PEREIRA, M.C.D. Y JANZ, J.G. (1990). Kala-azar en Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijó (Endemic region of Alto Douro). *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 (supl., 2): 766.

ACEDO SANCHEZ, C.; MORILLAS MARQUEZ, F.; MARTIN SANCHEZ, J. Y SANCHIS MARIN, M.C. (1991). Leishmaniosis canina en el medio urbano del sur de España. ICASEP I, Valencia: 309.

ADDADI, K. Y DEDET, J.P. (1977). Un nouveau cas de gynandromorphisme chez *Sergentomyia minuta parroti* (Adler et Theodor, 1927) (Diptera, Psychodidae). *Archs. Inst. Pasteur Alg.* 52: 135-138.

ADLER, S. Y THEODOR, O. (1931). Investigations on Mediterranean Kala-azar. III. The sandflies of the Mediterranean Basin. Distribution and bionomics of sandflies in Catania and district. *Proc. Roy. Soc. London B.* 108: 464-480.

ADLER, S. Y THEODOR, O. (1932). Investigations on Mediterranean Kala-azar VI.- Canine Visceral Leishmaniasis. *Proc. Roy. Soc. London.* 110: 402-411.

ALLAIN, D.S. (1964). Evaluation of the Viability and Pathogenicity of Hemoflagellates After Freezing and Storage. *J. Parasitol.* 50 (5): 604-607.

ALTES, J.; SALAS, A.; RIERA, M.; UDINA, M.; GALMES, A.; BALANZAT, J.; BALLESTEROS, A.; BUADES, J.; SALVA, F. Y VILLALONGA, C. (1991). Visceral leishmaniasis: another HIV-associated opportunistic infection?. Report of eight cases and review of the literature. *AIDS* 5 (2): 201-207.

ALVAR, J. (1988). *Caracterización molecular de Leishmania infantum. Aplicación al estudio clínico-epidemiológico*. Tesis Doctoral. Fac. Medicina, Univ. Complutense de Madrid: 254pp.

ALVAR, J. (1990a). Diagnostic and epidemiological problems in leishmaniasis and immunosuppressive association. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 (Supl, 1): 341.

ALVAR, J.; BALLESTEROS, J.A.; SOLER, R.; BENITO, A.; VAN EYS, G.J.J.M.; SCHOONE, G.J. Y CABRER, B. (1990b). Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: biochemical characterization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43 (6): 614-618.

ALVAR, J. Y BENITO, A. (1989a). Leishmaniosis mucocutánea (LMC) por *L. (L) infantum*: Caracterización bioquímica del aislado. *Resumen del VI Congr. Nac. y I Congr. Ibér. de Parasitol.*, Cáceres, 288.

ALVAR, J.; BLAZQUEZ, J. Y NAJERA, R. (1989b). Association of Visceral Leishmaniosis and Human Immunodeficiency Virus Infection. *J. Infect. Dis.* 160 (3): 560-561.

ALVAR, J.; VERDEJO, J.; OSUNA, A. Y NAJERA, R. (1987a). Visceral leishmaniasis in a patient seropositive for HIV. *European J. Clin. Microbiol.* 6 (5): 604-606.

ALVAR, J.; GUTIERREZ SOLAR, B.; AGUILAR, A.; CASTILLO, J.A. Y LUCIENTES, J. (1990c). Análisis del ADN de *Leishmania infantum*: caracterización de aislados de diferentes mamíferos. *Resumen Congr. Zoonosis I Interautonómico Español*, Valencia: 231-232.

ALVAR, J. Y ORTIZ, M. (1987b). Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en la provincia de Madrid. *Rev. Ibér. Parasitol.* Vol. Extra: 45-50.

ANGELICI, M.C.; GRAMICCIA, M. Y GRADONI, L. (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology* 99: 301-309.

ANTUNES, F.; CARVALHO, C.; TAVARES, L.; BOTAS, J.; FORTE, M.; RIO, A.M. del; DUTSCHMANN, L.; COSTA, A.; ABRANCHES, P.; PEREIRA, C.S.; PAIVA, J.E.D.; ARAUJO, F.C. Y BAPTISTA, A. (1987). Visceral leishmaniasis recrudescence in a patient with AIDS. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81 (4): 595.

ASHFORD, R.W. (1974). Sandflies (Diptera, Phlebotomidae) from Ethiopia: Taxonomic and biological notes. *J. Med. Entomol.* 11: 605-616.

BADARO, R.; CARVALHO, E.; ROCHA, H.; QUEIROZ, A.C. Y JONES, T.C. (1986a). *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet* 1 (8482): 647-649.

BADARO, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIZEIRA, R. Y JOHNSON, W.D., Jr. (1986b). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 154 (6): 1003-1011.

BADARO, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R. Y JOHNSON, W.D., Jr. (1986c). A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect. Dis.* 154 (4): 639-649.

BADARO, R.; REED, S.G. Y CARVALHO, E.M. (1983). Immunofluorescent antibody sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32 (3): 480-484.

BELAZZOUG, S. (1986a). *Leishmania infantum*, causative organism of visceral leishmaniasis at Biska (Algeria). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* (correspondance) 80: 1002.

BELAZZOUG, S. (1986b). La leishmaniose en Algérie à travers l'identification isoenzymatique des souches. In : *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco.épidémiologiques.* Rioux, J.A., edit IMEEE, Montpellier: 6.

BELAZZOUG, S.; LANOTTE, G.; MAAZOUN, R.; PRATLONG, F. Y RIOUX, J.A. (1985). Un nouveau variant enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent de la leishmaniose cutanée du nord de l'Algérie. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60 (6): 1-3.

BEN-ISMAIL, R.; KEDOUS, A.; SAIDI, M.; SIDHOM, M Y BENRACHID, M.S. (1990). Selective elimination of seropositive dogs to control kala-azar in Tunisia. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 (supl., 1): 454.

BENAVIDES, I.; MORILLAS, F.; GONZALEZ CASTRO, J.; REYES, A. Y VALERO, A. (1985). Aislamiento de *Leishmania* sp. en *Rattus rattus* en la provincia de Granada. Resumen IV Congr. Nac. Parasitol., Tenerife: 224.

BERGEUD, P. (1988). L'apport de la corticothérapie dans le traitement de certaines formes de leishmaniose canine: Résultats sur une série de quarante-trois cas. *Pratiqu. méd. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23 n° especial (5): 121-127.

BETTINI, S. Y GRADONI, L. (1986a). Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect Science and its Application*. 7 (2) 241-245.

BETTINI, S.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. Y ATZENI, M.C. (1986b). Leishmaniasis in Sardinia. II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in the province of Cagliari. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 458-459.

BETTINI, S.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; POZIO, E.; MUGNAI, S. Y MAROLI, M. (1983). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VIII- Human population response to leishmanin in the focus of Monte Argentario (Grosseto) and epidemiological evaluation. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58 (6): 539-547.

BETTINI, S.; POZIO, E. Y GRADONI, L. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (II) *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a Human and Canine leishmaniasis focus. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74 (1): 77-83.

BETTINI, S.; CONI, V.; SCARANO, C.; COGONI, M. Y ATZENI, M.C. (1985). Aspetti recenti della leishmaniosi canina nelle province di Cagliari e Oristano: segnalazione de 123 casi. *Nuovo Progresso Veterinario* 40 (2): 77-80.

BOCTOR, F.N.; STEK, M.J.; PETER, J.B. Y KAMAL, R. (1987). Simplification and standardization of Dot-ELISA for human schistosomiasis mansoni. *J. Parasit.* 73 (3): 589-592.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M Y SULBACH, W. (1990). Evasion strategies of *Leishmania* parasite. *Parasitology Today* 6 (6): 183-187.

BOLOS, O., de Y VIGO, J. (1984). *Flora dels Països Catalans. Vol I. (Introducció. Licopodiàcies-Capparàcies)*. Edit. Barcino: 740pp.

BONFANTE GARRIDO, R.; MELENDEZ, E.C.; TORRES, R.A.; MORILLO, N.C.; ARREDONDO, C.C. Y URDANETA, I. (1981). Enzootic equine cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 471.

BOTET FREGOLA, J. (1991a). *Los Phlebotomidae (Insecta, Diptera) de Barcelona en tanto que vectores de Leishmania Ross, 1903. Contribución a su conocimiento*. Tesis Doctoral, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona: 310pp.

BOTET, J. GALLEGO, M. Y PORTUS, M. (1989). Estudio preliminar sobre la distribución y fenología de los flebotomos en Barcelona. Resumen VI Congr. Nac. y I Congr. Ibér. Parasitol., Cáceres: 200.

BOTET, J.; SEGUI, M.G.; GALLEGO, M. Y PORTUS, M. (1991b). Sesgos derivados del método de captura en estudios sobre Flebotómidos (Diptera, Psychodidae). ICASEP I, Valencia: 366.

BOTET, J.; SERRA, T.; PORTUS, M.; MORA, R. Y GALLEGO, M (1987). Incidencia de la leishmaniosis en el área de Barcelona. *Rev. Ibér. Parasitol.* Vol. Extra: 51-54.

BOURDEAU, P. (1988). Eléments de la relation hôte-parasite au cours de l'infection leishmanienne et conséquences. *Pratiqu. méd. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23 nº especial: 57-72.

BRANDONISIO, O.; ALTAMURA, M.; CARELLI, G.; CECI, L.; ANTONACI, S. Y JIRILLO, E. (1989). Lymphocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *EOS Roma* 9 (2): 37-40. (Abstract).

BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; CECI, L.; CONSENTI, B.; FASANELLA, A. Y PUCCINI, V. (1990). Canine and human leishmaniasis in the Gargano Promontory (Apulia, south Italy). *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 (supl., 2): 769.

BRAY, R (1982). The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. *Ecology of Disease* 1 (4): 257-267.

CABASSU, J.P.; GERVAIS, P. Y SEGURET, N. (1988). Manifestations cliniques de la leishmaniose canine. *Pratiqu. méd. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23, nº especial: 29-34.

CAIXA DE CATALUNYA (1989): Priorat. In: *Guía de Catalunya. Todos los pueblos y todas las comarcas.* Edit Caixa de Catalunya: 227-231.

CAMPINO, L.; AVELINO, I.C.; SANTOS GOMES, G.M.; SEIXAS LOPEZ, A.; SAMPAIO SILVA, M.L. Y ABRANCHES, P. (1991). Leishmaniose canina na regio do Alto-Douro (Portugal). ICASEP I, Valencia: 273.

CAÑAVATE, M.C.; VITUTIA, M.M.; WALTON, R. (1990). Preliminary observations on canine leishmaniasis prevalence on the island of Gozo, Malta. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 (supl., 2): 808.

CARDA APARICI, P. (1949). Estudios sobre leishmaniosis canina. *Rev. San. Vet.* 4 (11): 884-906.

CARVALHO, E.M.; BADARO, R.; REED, S.G.; JONES, T.C. Y JONHSON, D. Jr. (1985). Absence of gamma interferon and interleukin II production during active visceral leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 76: 2066-2069.

CASTILLO HENANDEZ, J.A.; SANCHEZ ACEDO, C.; GUTIERREZ GALINDO, J.F.; LUCIENTES CURDI, J.; ESTRADA PEÑA, A. Y GALMES FEMENIAS, M. (1985). . . . . Resumen IV Congr. Nac. de Parasitol. Tenerife: 31.

CASTILLO HERNANDEZ, J.A.; LUCIENTES CURDI, J.; MOLINA, R.; PERIBANEZ LOPEZ, M.A.; BENITO DE MARTIN, I. Y ALVAR EZQUERRA, J. (1991). Estudio de la población de *Phlebotomus* spp. en el foco de leishmaniosis de Zaragoza mediante el análisis de los hidrocarburos de cutícula. Datos preliminares. ICASEP I, Valencia: 170.

CATARSINI, O. (1981). Epidemiologia e manifestazioni cliniche della leishmaniosi del cane. *Riv. Parassitol.* XLII (2, suppl): 83-87.

CERF, B.J.; JONES, T.C.; BADARO, R.; SAMPAIO, R.; TEIXEIRA, R. Y JOHNSON, W.D. Jr. (1987). Malnutrition as a risk factor in visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 156: 1030-1033.

CHAN, S.W. Y KO, R.C. (1988). Comparison between standard ELISA and Dot-ELISA for serodiagnosis of human trichinosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 892-894.

CHANG, K.P. Y HENDRICKS, L.D. (1985). Laboratory cultivation and maintenance of *Leishmania*. In: *Leishmaniasis*. K.P., Chang y R.S. Bray Edit. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division): 213-244.

CHANG, K.P. Y BRAY, R.S. (1985). *Human Parasitic Disease, Vol. I. Leishmaniasis*. Series Eds. E.J. Ruitenberg y A.J. MacInnis, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Amsterdam, New York, Oxford: 490pp.

CHOUDHRY, A.; GURU, P.Y.; SAXENA, R.P.; TANDON, A. Y SAXENA, K.C. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of kala-azar in Ahadohi (Varanasil), India. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84 :363-366.

CONDOM, M.J.; CLOTET, B.; SIRERA, G.; MILLA, F. Y FOZ, M. (1989). Asymptomatic leishmaniasis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). (correspondance). *Ann. Intern. Med.* 111 (9): 767-768.

CORACHAN, M.; PORTUS, M.; FILELLA, E. Y OLLE, J.E. (1987). La leishmaniosis en Cataluña. Estudio preliminar. *Rev. San. Hig. Púb.* 61: 1229-1236.

COVALEDA, J.; VIVES, J. y SOLER DURALL, C. (1951). Leishmaniosis canina en Barcelona (Nota previa). *Rev. San. Hig. Púb.* 25: 708-712.

CRAIG, T.M.; BARTON, C.L.; MERCER, S.H.; DROLESKEY, B.E. Y JONES, L.P. (1986). Dermal leishmaniasis in a Texas cat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35 (6): 1100-1102.

CROSET, H.; RIOUX, J.A., LEGER, N.; HOUIN, R.; CADI SOUSSI, M.; BENMANSOUR, N. Y MAISTRE, M. (1977). Les méthodes d'échantillonnage des populations de phébotomes en region

méditerranéenne. In: *Ecologie des Leishmanioses*. Coll. CNRS. n° 239: 139-151.

CROSET, H.; RIOUX, J.A.; MAISTRE, M. Y BAYAR, N. (1978). Les phlébotomes de Tunisie (Diptera-Phlebotomidae). Mise au point systématique, chorologie et ethologie. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 53: 711-749.

DE LA SERNA, F.J.; SALTO, E.; VALDES, D. Y VOS SAUS, R. (1987). Estudio clínico-epidemiológico del Kala-azar en el sur de Madrid. *Rev. San. Hig. Púb.* 61: 783-798.

DEDET, J.P. y LANOTTE, G. (1969). Culture en masse de *Leishmania* pour la préparation d'antigènes. *Archs. Inst. Pasteur Tunis* 46: 69-81.

DEREURE, J. (1986). *Mise au point d'une réaction d'agglutination de particules de latex en vue du diagnostic immunologique et de l'étude éco-épidémiologique de la leishmaniose viscérale*. D.E.A., Univ. Sciences et Techniques du Languedoc: 32pp.

DOLMATOVA, A.V. Y DEMINA, N.A. (1971). Les phlébotomes (Phlebotaminae) et les maladies qu'ils transmettent. *Off. Rech. Sci. Tech. Outre-Mer*, docum. tech. n°18, 168pp.

DUNAN, S. Y TOGA, I. (1988). Immunologie et leishmaniose. *Pratiqu. médic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie* 23 n°especial: 81-87.

DUNAN, S.; TOGA, I.; MARY, C.; ESCOFFIER, K; FROMMEL, D.; MONJOUR, L.; QUILICI, M Y COL. (1989). Essais de vaccination sur une population canine en zone d'infestation leishmanienne. *Rev. Méd. Vét.* 140 (11): 1005-1009.

DYE, C. (1988): The epidemiology og canine visceral leishmaniasis in the southern France: classical theory offers another explanation of the data. *Parasitology* 96: 19-24.

E.N.S. (1984). Documento inédito. (En Alvar, 1988).

EL AMIN EL ROUFAIE MOHAMMED; WRIGHT, E.P.; KAGER, P.A.; LAARMAN, J.J. Y PODMAN, K.W. (1985). ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79 :344-350.

EL AMIN EL ROUFAIE MOHAMMED; WRIGHT, E.P.; ABDEL RAHMAN, A.M.; KOLK, A.; LAARMAN, J.J. Y PONDMAN, K.W. (1986). Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80 (2): 271-274.

EL HARITH, A.E.; KOLK, A.H.J.; KAGER, P.A.; LEEUWENBURG, J.; MUIGAI, R.; KIUGU, S.; KIUGU, S Y LAARMAN, J.J. (1986). A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral

leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80 (4): 583-587.

EL HARITH, A.; SLAPPENDEL, R.J.; REITER, I.; KNAPEN, F. VAN; KORTE, P. DE; HUIGEN, E. Y KOLK, A.H.J. (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.* 27 (10): 2252-2257.

ENCINAS GRANDES, A.; GOMEZ BAUTISTA, M.; MARTIN NOVO, M. Y SIMON MARTIN, F. (1988). Leishmaniasis in the province of Salamanca, Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 63 (6): 387-397.

EVANS, D.A. (1987a). *Leishmania*. En: *In vitro Methods for parasite cultivation*. Edit. A.E.R., Taylor y J.R., Baker. Academic Press: 52-75.

EVANS, D.A.; KENNEDY, W.P.K.; ELBIHARI, S.; CHAPMAN, C.J.; SMITH, V. Y PETERS, W. (1987b). Hybrid formation within the genus *Leishmania*?. *Parassitologia* 29: 165-173.

EVANS, T.G.; SMITH, D. Y PEARSON, R.D. (1990). Humoral factors and nonspecific immune suppression in syrian hamsters with *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.* 76 (2): 212-217.

FERNANDEZ GUERRERO, M.L.; AGUADO, J.M.; BUZON, L.; BARRES, C.; MONTALBAN, C.; MARTIN, T. Y BOUZA, E. (1987). Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. *Am. J. Med.* 83: 1098-1102.

FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J.A. y DOMINGO, M. (1988). Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Animal Practice* 29 (6): 381-388.

FISA, R.; GALLEGU, M.; PORTUS, M. Y MORA, R. (1987). La técnica "Dot-ELISA"-Proteína-A-Peroxidasa y su utilización en el estudio seroepidemiológico de los reservorios de *Leishmania*. Resumen V Congr. Nac. Parasitol. Salamanca: 297-298.

FISA, R.; GALLEGU, J.; GALLEGU, M. Y PORTUS, M. (1990a). Anomalías observadas en 37 ejemplares de *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), procedentes de un mismo enclave (Priorato: Tarragona). Resumen IV Congr. Ibér. Entomol., Sant Feliu de Guixols, Gerona:.....

FISA, R.; GALLEGU, M.; PORTUS, M. Y GALLEGU, J. (1990b). Evolución de la leishmaniosis canina en zona endémica, a través de su seguimiento serológico. Resumen Congr. Zoonosis I Interautonómico Español, Valencia: 179.

FOLCH I GUILLEN, R. (1986). *La Vegetació dels Països Catalans*. Edit. Ketres S.A.: 541pp.

FRAGA DE ACEVEDO, J. (1948). Sur la transmission du kala-azar méditerranéen. *Ann. Inst. Med. Trop.* 5: 269-287.

FRANCK, J.; GAMBARELLI, F. Y QUILICI, M. (1986). Intérêt d'une réaction d'agglutination directe dans le diagnostic du kala-azar méditerranéen et dans le dépistage du réservoir de virus canin de cette parasitose. *Méd. et Maladies. Infect.* 8/9 : 506-510.

FRIAS I ROIG, A. (1914). Tres casos de "Kala-azar infantil" del partido judicial de Reus. *Rev. Clínica de Madrid.* 165-174.

FRIAS I ROIG, A. (1918). El Kala-azar Infantil en Reus y su Comarca. *Arch. Español. de Pediatría.* 8: 321-349.

FULLAT ARAGONES. (1927). El boton de Oriente en el Priorato y Campo de Tarragona. *Rev. Med. de Barcelona* a IV, t VIII.

GALLEGO, J.; BOTET, J.; GALLEGO, M. Y PORTUS, M. (en prensa). Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. Libro Homenaje al Profesor F. de P. Martínez Gómez. Edit. Univ. Córdoba.

GALLEGO, J.; GALLEGO, M.; FISA, R. Y PORTUS, M. (1991, en prensa). Gynandromorphism in sanflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) with reference to thirty-one new cases in an isolated *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) population. *Research and Reviews in Parasitology, Rev. Ibér. Parasitol.* 51.

GALLEGO, J. Y PORTUS, M. (1986). Etude préliminaire de la leishmaniose humaine et canine en Catalogne-Sud. A propos de l'étude enzymatique de quatre souches. In : *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco.épidémiologiques.* Rioux, J.A., edit IMEEE, Montpellier: 22.

GALLEGO, M.; RIOUX, J.A.; RISPAIL, P.; GUILVARD, E.; GALLEGO, J.; PORTUS, M.; DELALBRE, A.; BASTIEN, P.; MARTINEZ ORTEGA, E. Y FISA, R. (1990). Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Phsychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Rev. Ibér. Parasitol.* 50 (1-2): 123-127.

GARNHAM, P. C. C. (1965). The leishmanias with special reference to the role of animal reservoirs. *Am. Zoologist.* 5: 141-151.

GARNHAM, P.C.C. (1987). Introduction. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol I. Biology and Epidemiology.* W. Peters y R. Killick-Kendrick Edit. Academic Press: xiii-xxv.

GENERALITAT DE CATALUNYA (1981). *El Priorat. Anàlisi econòmica i possibilitats de desenvolupament.* Direcció General de Política Territorial, Departament de Política Territorial i Obres Públiques, Generalitat de Catalunya. Edit Ketres S.A: 270pp.

GENERALITAT DE CATALUNYA. (1982-1988). *Butlletí Epidemiològic de Catalunya*. Barcelona. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya.

GEOFFREY, B. (1984). Un cas de gynandromorphisme chez *Lutzomyia (Lutzomyia) rorotaensis* Floch et Abbonenc, 1944 (diptera, Psychodidae). *Cahiers ORSTOM, Serie d'Entomol. Med. et Parasitol.* 22: 257-260.

GHOSE, A.C.; HALDAR, J.P.; PAL, S.C.; MISHRA, B.P. Y MISHRA, K.K. (1980). Serological investigations on Indian kala-azar. *Clin. exp. Immunol.* 40: 318-326.

GIANNINI, S.H. (1985). Induction and detection of leishmanial infections in *Rattus norvegicus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79 (4): 458-461.

GIL COLLADO, J.; MORILLAS MARQUEZ, F. Y SANCHIS MARIN, M.C. (1989). Los flebotomos en España. *Rev. San. Hig. Púb.* 63: 15-34.

GIRAUD, P. Y CABASSU, H. (1936). Le diagnostic de la Leishmaniose canine par la ponction ganglionnaire. *Bull. Soc. Path. Exot.* 29: 958-963.

GODING, J.W. (1978). Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods* 20 :241-253.

GOMEZ NIETO, C.; HERNANDEZ, S.; ANGUIANO, A. Y GUTIERREZ, P.N. (1985). Clínica de la leishmaniosis canina en Córdoba. Resumen IV Congr. Nac. Parasitol., Tenerife: 169.

GONZALEZ CASTRO, J.; MORILLAS MARQUEZ, F. Y BENAVIDES DELGADO, I. (1987). *Leishmania infantum* s. str. parasite du rat noir (*Rattus rattus*). A propos du typage enzymatique d'une souche isolée en Espagne dans la province de Granada. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 62 (1): 101.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Y BETTI, M. (1990). Fatal visceral disease caused by a dermatropic *Leishmania* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect.* 20: 169-184.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. Y PIERI, S. (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82 (4): 568-571.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; PETTOELLO, M.; DI MARTINO, L. Y NOCERINO, A. (1987a). A new *Leishmania infantum* enzymatic variant, agent of an urban visceral case unresponsive to drugs. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81 : 927-928.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Y POZIO, E. (1984). Stato attuale della tassonomia di *Leishmania* nel bacino del Mediterraneo. *Parassitologia.* 26: 289-297.

GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M. Y MANCIANTI, F. (1987b). *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medical and Veterinary Entomology* 1 (4): 339-342.

GRADONI, L.; POZIO, E.; BETTINI, S. Y GRAMICCIA, M. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): III. The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 421-422.

GRADONI, L.; POZIO, E.; GRAMICCIA, M.; MAROLI, M. Y BETTINI, S. (1983). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77 (4): 427-431.

GRAMICCIA, M.; BETTINI, S.; GRADONI, L.; CIARMOLI, P.; VERRILLI, M.L.; LODDO, S. Y CICALO, C. (1990). Leishmaniasis in Sardinia. 5. Leishmanin reaction in the human population of a focus of low endemicity of canine leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 371-374.

GRAMICCIA, M.; BETTINI, S.; GRADONI, L. Y POZIO, E. (1982a). *Leishmania* isolates from mammals in Italy. *Acta Med. Pat. Infet. Trop.* 1 (1, suppl.): 103-108.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. Y POZIO, E. (1986). Characterisation des leishmanies isolées en Italie. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applicatios éco-épidémiologiques*. Rioux, J.A. Eds. IMEEE, Montpellier,...

GRAMICCIA, M.; MAAZOUN, R.; LANOTTE, S.; RIOUX, J.A.; LE BLANCQ, S.; EVANS, D.A.; PETERS, W.; BETTINI, S.; GRADONI, L. Y POZIO, E. (1982b). Typage enzymatique de onze souches de *Leishmania* isolées, en Italie continentale, a partir de formes viscérales murines, canines et vulpines. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57 (6): 527-531.

*Gran Enciclopèdia Catalana* (1978). Vol. 12. Edit. Enciclopèdia Catalana, S.A. ...

GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R.B. Y MCMAHON-PRATT, D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41 (6): 687-725.

GROULADE, P. Y BOURDEAU, P. (1988). Moyens pratiques de mise en évidence des leishmanies. *Pratiq. médic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23 N°spécial: 73-79.

GUEVARA BENITEZ, D.C.; UBEDA ONTIVEROS, J.M. Y MORILLAS MARQUEZ, F. (1978). Phlebotominae de la provincia de Granada: estudio de poblaciones. *Rev. Ibér. Parasitol.* 38: 813-839.

GUIMARAES, M.C.S.; CASTILHO, E.A.; CELESTE, B.J.; NAKAHARA, O.S. Y AMATO NETTO, V. (1985). Long-term storage of IgG and IgM on filter paper for use in parasitic disease seroepidemiology surveys. *Bull. Pan American Health Organization* 19 (1): 16-28. (Abstract).

GUSTAFSON, T.L.; REED, C.N.; MCGREEVY, P.B.; PAPPAS, M.G.; FOX, J.C. Y LAWYER, P.G. (1985). Human cutaneous leishmaniasis acquired in Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34 (1): 58-63.

GUY, M.W.; KILLICK-KENDRICK, R.; GILL, G.S.; RIOUX, J.A. Y BRAY, R.S. (1984). Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the C enennes by bloodmeal analyses. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59 (5): 449-458.

HARRISON, L.H.; NAIDU, T.G.; DREW, J.S.; DE ALENCAR, J.E. Y PEARSON, R.D. (1986). Reciprocal relationship between undernutrition and the parasitic disease leishmaniasis. *Rev. Infect. Dis.* 8: 447-453.

HAWKES, R.; NIDAY, E. Y GORDON, J. (1982). A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119: 142-147.

HERNANDEZ RODRIGUEZ, S.; GOMEZ NIETO, C.; MARTINEZ GOMEZ, F. Y GUTIERREZ PALOMINO, P (1987). Aspectos clínicos de la leishmaniosis canina. *Rev. Ib r. Parasitol.* Vol Extra: 61-66.

HO, M.; LEEUWENBURG, J.; MBUGUA, G.; WAMACHI, A. Y VOLLER, A. (1984). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32 (5): 943-946.

HO, M.; SIONGOK, T.K.; LYERLY, W.H.; SMITH, D.H. (1982). Prevalence and disease spectrum in a new focus of visceral leishmaniasis in Kenya. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76 (6): 741-746.

HOMMEL, M.; PETERS, W.; RANQUE, J.; QUILICI, M. Y LANOTTE, G. (1978). The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72 (3): 213-218.

HOOGSTRAAL, H.; VAN PEENEN, P.F.D.; REID, T.P. Y DIETLEIN, D.R. (1963). Leishmaniasis in the Sudan Republic. 10. Natural infections in rodents. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12: 175-178.

HOWARD, J.G. (1985). Host immunity to Leishmaniasis. In: *Leishmaniasis. (Human Parasitic Diseases Vol. 1)*. Edit. K.P. Chang y R.S. Bray. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division): 139-162.

IGLESIAS, J. (1974). *Geografia de Catalunya. III. Geografia comarcal.* - 2. VI. Priotat Edit. AEDOS. ???pp.

JAHN, A. Y DIESFELD, H.J. (1983). Evaluation of a visually read ELISA for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of kala-azar in the Baringo district, Kenya. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77 (4): 451-454.

JAMBOU, D.; MARTY, P.; JAMBOU, R.; FICHOUX, Y. LE; HAAS, P.; JORDAIN, N. Y BAYADA, M. (1986). Preliminary serological study on canine leishmaniasis in the Alpes-Maritimes Departement, France. (correspondance) *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80 (4): 666-667.

JIMENEZ, M.I.; GARCIA, E.; CERCENADO, E. Y ALVAR, J. (1991). Caracterización isoenzimática en geles de poliacrilamida de ocho aislados de *Leishmania* de sujetos HIV positivos de la provincia de Madrid. ICASEP I, Valencia: 146.

JOLIVET, E. (1977): Essay de modélisation analytique du développement d'un foyer de leishmaniose canine. In: *Ecologie des Leishmanioses*. Coll. CNRS. n° 239: 307-310.

KAGAN, I.G. (1972). Evaluation of the indirect hemagglutination test as an epidemiologic technique for malaria. *Am. J. Trop. Hyg.* 21 (5): 683-689.

KAGAN, I.G.; MATHEWS, H.M.; ROGERS, W.A. Jr. Y FRIED, J. (1969). Seroepidemiological studies by indirect Haemogglutination test for Malaria. *Bull. Wld. Hlth Org.* 41: 825-841.

KILLICK-KENDRICK, R. (1979). Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. En: *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 2 Eds. W.H.R. Lumsden y D.A. Evans. Academic Press: London/New York/San Francisco, 395-460.

KILLICK-KENDRICK, R. (1987). Studies and criteria for the incrimination of vectors and reservoir host of the leishmaniasis. *Proc. Intern. Workshop of Research and Control strategies for the leishmaniasis*, Ottawa: 272-280.

KILLICK-KENDRICK, R. (1990a). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4: 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. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65 suppl. I: 37-42.

KILLICK-KENDRICK, R.; READY, P.D. Y PAMPIGLIONE, S. (1977). Notes on the prevalence and host preferences of *Phlebotomus perfiliewi* in Emilia-Romagna, Italia. In: *Ecologie des Leishmanioses*. Coll CNRS n° 239: 169-175.

KILLICK-KENDRICK, R. Y RIOUX, J.A. (1981). The Cévennes focus of leishmaniasis in southern France and the biology of the

vector, *Phlebotomus ariasi*. In *Parasitological Topics. A presentation volume to P.C.C. Garnham F.R.S. on the occasion of his 80<sup>th</sup> birthday*. Soc. Protozoologists, spec. publ. n° 1: 136-145.

KNECHTLI, L.J. (1989). Distribution and relative density of three sandfly (Diptera: Phlebotominae) species in southern Switzerland. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64 (1): 53-63.

KORTE, P.M. DE; EL HARITH, a.; DEREURE, J.; HUIGEN, E.; FAUCHERRE, V. Y VON DE KAA, H.J. (1990). Introduction of an improved direct agglutination test for the detection of *Leishmania infantum* infection in southern France. *Parasitol. Res.* 76: 526-530.

LAINSON, R. Y SHAW, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol I. Biology and Epidemiology*. W. Peters y R. Killick-Kendrick Edit. Academic Press: 1-120.

LANOTTE, G. (1975). *Le foyer de leishmaniose viscérale des Cévennes. Limites et structures. Essai méthodologique*. Tesis Doctoral Fac. Med. Univ. Montpellier, 269 pp.

LANOTTE, G. Y RIOUX, J.A. (1990). Mise en évidence d'un processus de cytogamie chez les *Leishmania* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65 (1): 47-48.

LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; CROSET, H. Y VOLLHARDT, Y. (1977). Dépistage de la leishmaniose canine. Stratégie d'enquête utilisée dans le foyer des Cévennes Méridionales. In: *Ecologie des Leishmanioses*. Coll. CNRS. n° 239: 117-130.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; CROSET, H. Y VOLLHARDT, Y. (1978). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 9. Les méthodes d'échantillonnage dans la dépistage et l'analyse de l'enzootie canine. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 53 (1): 33-45.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; MAAZOUN, R.; PASTEUR, N.; PRATLONG, F. Y LEPART, J. (1981). Application de la méthode numérique à la taxonomie de genre *Leishmania* Ross, 1903. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien Monde. Utilisation des allozymes. Corollaires épidémiologiques et phylétiques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 56: 575-592.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PERIERES, J. Y VOLLHARDT, Y. (1979). Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 54 (3): 277-295.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A. Y PRATLONG, F. (1980). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 14. Les leishmanioses humaines en Cévennes. Analyse clinique et biologique des formes viscérales et muqueuses. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 55 (6):

635-643.

LE BLANCQ, S.M.; CIBULSKIS, R.E. Y PETERS, W. (1986a). *Leishmania* in the Old World: 5. Numerical analysis of isoenzyme data. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 517-524.

LE BLANCQ, S.M.; LANHAM, S.M. Y EVANS, D.A. (1987). Comparative isoenzymes profiles of Old and New World *Leishmania*. In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol. II. Edit. W. Peters y R. Killick-Kendrick : 543-550.

LE BLANCQ, S.M. Y PETERS, W. (1986b). *Leishmania* in the Old World: 4. The distribution of *L. donovani sensu lato* zymodemes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80 (3): 367-377.

LEGER, N. (1977). L'épidémiologie des leishmanioses (Pathologie comparée) *L'Animal de Compagnie* 2: 113-119.

LEGER, N.; PESSON, B.; MADULO-LEBLOND, G. Y COLLOMB, J. (1982). Trois cas d'anomalies morphologiques dont un gynandromorphisme chez *Sergentomyia minuta* et *S. dentata* (Diptera, Phlebotomidae) de Grèce. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57: 105-107.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O. Y COX, F.E.G. (1980). A newly revised clasification of the Protozoa. *J. Protozool.* 27: 37-58.

LEWIS, D.J. (1971). Phlebotomid Sandflies. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 44: 535-551.

LOCKSLEY, R.M. Y SCOTT, P. (1991). Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction , expansion and efecctor function. *Immunoparasitology Today* (Ash, C. y Gallagher, R.B. eds.), Elsevier trends Journals, Cambridge: A58-A61.

LUCIENTES CURDI, J. (1986). *Contribución al conocimiento epidemiológico de la leishmaniosis visceral canina: Estudio biológico y ecológico de las poblaciones de los flebotomos vectores*. Tesis Doctoral Fac. Veterinaria, Univ. Zaragoza: 499pp.

LUCIENTES CURDI, J.; DE BENITO MARTIN, I.; SANCHEZ ACEDO, C.; PERIBAÑEZ LOPEZ, M.A. Y GRACIA SALINAS, M. (1989). Los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae) en un foco de leishmaniasis en el Pirineo central de Huesca. Resumen VI Congr. Nac. y I Congr. Ibér. de Parasitol., Cáceres: 198.

LUCIENTES CURDI, J.; SANCHEZ ACEDO, C.; CASTILLO HERNANDEZ, J.A. Y ESTRADA PEÑA, A. (1988). Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniosis de Zaragoza. *Rev. Ibér. Parasitol.* 48 (1): 7-8.

LUPASCU, G.; DUPORT, M.; DANCESCU, P. Y CRISTESCU, M. (1977). Ethologie et phénologie des phlébotomes vecteurs potentiels de la leishmaniose en Roumanie. In: *Ecologie des Leishmanioses*.

Coll. CNRS. n° 239: 191-193.

LYSENKO, A.J. Y BELIAEV, A.E. (1977). Some problems of primary importance concerning the epidemiology of leishmaniasis in the Mediterranean Middle Asian Region. In: *Ecologie des Leishmanioses* coll. CNRS n° 239: 249-256.

MA, D.D.F.; CONCANNON, A.J. Y HAYES, J. (1979). Fatal leishmaniasis in renal transplant patient. *Lancet* ii: 311-312.

MAAZOUN, R.; LANOTTE, G.; PASTEUR, N.; RIOUX, J.A.; KENNOU, M.F. Y PRATLONG, F. (1981a). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 16. Contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. A propos de 55 souches isolées en Cévennes, Côte d'Azur, Corse et Tunisie. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 56 (2): 131-146.

MAAZOUN, R.; LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PASTEUR, N.; KILLICK-KENDRICK, R. Y PRATLONG, F. (1981b). Signification du polymorphisme enzymatique chez les *Leishmania*. A propos de trois souches hétérozygotes de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania.f. tarentolae* Wenyon, 1921 et *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 56: 467-475.

MAAZOUN, R.; PRATLONG, F.; LANOTTE, G. Y RIOUX, J.A. (1986). Le complexe *Leishmania major*. A propos de l'analyse numérique de 35 souches identifiées par le méthode isoenzymatique. In: *Leishmania. Applications éco-épidémiologiques* Rioux, J.A. eds. IMEEE, Montpellier: 239-247.

MANCIANTI, F.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; PIERI, S. Y MARCONCINI, A. (1986). Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. *Trop. Med. Parasitol.* 37 (2): 110-112.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. Y PIERI, S. (1988a). Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82 (4): 566-567.

MANCIANTI, F. Y MECIANI, N. (1988b). Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination and counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Research* 49 (8): 1409-1411.

MANSUETO, S. (1981a). Aspetti clinici abituali ed inconsueti della leishmaniosi viscerale dell' adulto. *Riv. Parasitol.* 42 (2, suppl.): 61-81.

MANSUETO, S.; DI LEO, R.; MICELI, M.D. Y QUARTARARO, P. (1982). Canine leishmaniasis in three foci in Western Sicily. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76 (4): 565-566.

MANSUETO, S.; GIALLOMBARDO, G.; MICELI, M.D. Y QUARTARARO, P. (1981b). Indagini epidemiologiche sulla leishmaniosi in Sicilia occidentale. Il focolaio canino dell'isola di Ustica. Primi rilievi. *Riv. Parassitol.* 42 (3): 433-441.

MANSUETO, S.; MICELI, M.D.; OCCHINO, C.; ROBERTO, D.; CORRIERE, G.; VITALE, G. Y MILANO, S. (1985). Indagini sieropidemiologiche sulla leishmaniosi in Sicilia Occidentale. Presenza di anticorpi anti-*Leishmania* (metodo microimmunofluorescenza) in un campione di sieri equini, bovini ed ovini. *G. Mal. Infet. Paras.* 37: 258-260.

MANSUETO, S.; PICONE, D.; LA CASCIA, C. Y DI ROSA, S. (1979). La controimmunelettroforesi (CIEP) su membrana di acetato di cellulosa (cellogel) nella diagnostica della leishmaniosi viscerale. *Ann. Sclavo.* 21 (1): 93-99.

MARIN INIESTA, F.; MARIN INIESTA, E. Y MARTIN LUENGO, F. (1982). Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la población murciana. Resultados preliminares. *Rev. Ibér. Parasitol.* 42 (3): 307-313.

MAROLI, M. Y BETTINI, S. (1977). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): I. An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto Province. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 315-321.

MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; READY, P.D.; SMITH, D.F. y AQUINO, C. (1988). Natural infections of flebotomine sandflies with Trypanosomatidae in central and south Italy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 227-228.

MAROLI, M.; POZIO, E.; GRADONI, L. Y GRAMICCIA, M. (1987). Sanfly species (Diptera, Psychodidae) colonizing new formed rock crevices in Apulia (Italy). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 62 (2): 185-187.

MARRUGAT, O.; GALLEGO, M.; GALLEGO, J.; FISA, R.; PORTUS, M.; VALLS, D.; RIERA, C. Y AISA, M.J. (1991). Datos preliminares sobre la fenología y distribución de los flebotomos (Diptera, Psychodidae) de una estación aislada del Priorato (Tarragona, España). ICASEP I, Valencia: 367.

MARTIN LUENGO, F.; SEGOVIA HERNANDEZ, M. RODRIGUEZ GONZALEZ, T. Y ARTERO GALAN, J.M. (1983). Leishmaniasis experimental en hamster. Resumen III Congr. Nac. de Parasitol., Barcelona: 84.

MARTINEZ CRUZ, M.S. (1989). *Estudio serológico de la leishmaniosis canina*. Tesis Doctoral, Fac. Veterinaria, Univ. Córdoba : 350pp.

MARTINEZ CRUZ, M.S.; MARTINEZ MORENO, A.; MARTINEZ MORENO, F.J.; MARTINEZ GOMEZ, F. Y HERNANDEZ RODRIGUEZ, S. (1990). Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba. *Rev. Ibér. Parasitol.* 50 (1-2): 1-7.

MARTINEZ MORENO, A.; MARTINEZ MORENO, F.J.; MOLINA CABALLERO, J.M. Y HERNANDEZ RODRIGUEZ, S. (1991). Respuesta inmune celular en la leishmaniosis experimental canina. ICASEP I, Valencia: 185.

MARTINEZ ORTEGA, E. (1986). *Los flebotomos (Diptera, Psychodidae) del sureste de la Península Ibérica*. Tesis Doctoral, Fac. Biología, Univ. Murcia: 270pp.

MARTINEZ ORTEGA, E. (1985). Los flebotomos ibéricos (Diptera: Psychodidae). I. Almería. *An. Biología, Biología Animal*, 1 3: 107-111.

MARTINEZ ORTEGA, E.; BELMONTE, A. Y GALLEGO, M. (1989a). Trois cas de gynandromorphisme chez *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) dans la Península Ibérica. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64 (1): 46-52.

MARTINEZ ORTEGA, E. Y CONESA GALLEGO, E. (1989b). Distribución altitudinal de los flebotomos (Diptera Psychodidae) del Sureste de la Península Ibérica. Resumen del VI Cong. Nac. y I Congr. Ibér. Parasitol., Cáceres: 201.

MARTINEZ ORTEGA, E.; WARD, R.D.; MARTIN LUENGO, F. Y CONESA GALLEGO, E. (1982). Introducción al estudio de flebotomos en Alicante y Murcia (Diptera: Phlebotomidae). *Rev. Ibér. Parasitol.* Vol Extra: 461-472.

MARTY, P. Y LE FICHOUX, Y. (1988a). Epidémiologie de la leishmaniose dans le sud de la France. *Pratiqu. médic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 23 (supl, 5): 11-15.

MARTY, P.; JAMBOU, D.; BAYADA, M.; JOURDAIN, N.; HAAS, P. Y LE FICHOUX, Y. (1986). Premières enquêtes, prospectives sur la leishmaniose canine dans trois localités du département des alpes Maritimes. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 4 (1): 21-24.

MARTY, P.; OZON, C.; JAMBOU, R.; BAYADA, M.; HAAS, P. Y LE FICHOUX, Y. (1988b). Nouvelles enquêtes prospectives sur la leishmaniose canine dans le departement des Alpes Maritimes. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 6 (1): 3-6.

MARTY, P.; PESCE, A.; FUZIBET, J.G.; BERNARD, E.; BERTRAND, F.; SAINT PAUL, M.C.; GARI TOUSSAINT, M Y LE FICHOUX, Y. (1989). Aspects biocliniques de la leishmaniose viscerale chez les sideens. A propos de 7 observations au C.H.U. de Nice. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 7 (2): 159-161.

MATAS MIR, B. Y ROVIRA DE ALOS, J. (1989). Estudio epidemiológico de la leishmaniosis canina en la isla de Mallorca. *Publ. Govern Balear. Conselleria de Sanitat i Seguretat Social:* 110pp.

MAUEL, J. Y BEHIN, R. (1987). Immunity: clinical and experimental. In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine* Vol II. W. Peters y R. Killick-Kendrick. Edit. Academic Press: 731-791.

MAYRINK, W.; CHIARI, C.A.; MAGALHAES, P.A. Y DA COSTA, C.A. (1972). Teste do latex no diagnostico do calazar americano. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 14: 273-276.

MEZQUIDA LOPEZ, G. (1990). *Estudio poblacional de los Phlebotomus (Diptera: Psychodidae) del Bajo Llobregat*. Tesina de Licenciatura. Fac. Farmacia, Univ. Barcelona: 294pp.

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. (1982-1988). *Boletín Epidemiológico Semanal*. Madrid.

MOLERO, J. (1976). *Estudio florístico y fitogeográfico de la Sierra de Montsant y su área de influencia*. Tesis Doctoral Fac. Farmacia, Univ. Barcelona: pp.

MOLYNEAUX, D.H. Y ASHFORD, R.W. (1983). En: *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals*. Edit. Taylor y Francis, London: 294pp.

MONTALBAN, C.; MARTINEZ FERNANDEZ, R.; CALLEJA, J.L.; GARCIA DIAZ, J DE D.; RUBIO, R.; DRONDA, F.; MORENO, S.; YEBRA, M.; BARROS, C.; COBO, J.; MARTINEZ, M.C.; RUIZ, F. Y COSTA, J.R. (1989). Visceral leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients infected with human immunodeficiency virus in Spain. *Reviews Infect. Dis.* 11 (4): 655-660.

MORENO, G. (1989). *Les complexes Leishmania donovani et Leishmania infantum. Implications taxonomiques, biogéographiques et épidémiologiques. A propos de l'analyse enzymatique de 548 souches de l'ancien et du Nouveau Monde*. Tesis doctoral. Academie de Montpellier, Univ. du Languedoc, 210pp.

MORENO, G.; RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F. Y SERRES, F. (1984). *Leishmania donovani* (Laveran et Mesnil, 1903) s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *L.infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques a propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveaux Monde. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applicatios éco-épidémiologiques*. Rioux, J.A. Eds. IMEEE, Montpellier, 105-117.

MORILLAS MARQUEZ, F. (1982). *Epidemiología de la leishmaniosis en la provincia de Granada: estudio biométrico, sistemático y del ciclo anual de los flebotomos*. Tesis doctoral, Fac. Farmacia, Univ. Granada: 223pp.

MORILLAS MARQUEZ, F.; ACEDO SANCHEZ, C.; SANCHIS MARIN, M.C.; MARTIN SANCHEZ, J.; REYES MAGAÑA, A.Y GUEVARA POZO, D. (1989). Determinación de la incidencia de la leishmaniosis canina en

jaurías del sur de España. VI Congr. Nac. y I Congr. Ibér. Parasitol. Cáceres: 212.

MORILLAS MARQUEZ, F.; BENAVIDES DELGADO, i.; GONZALEZ CASTRO, J.; REYES MAGAÑA, A. Y VALERO LOPEZ, A. (1985a). Occurrence of *Leishmania* sp. in *Rattus rattus* in the province of Granada (Spain). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60 (6): 768-770.

MORILLAS MARQUEZ, F.; GUEVARA BENITEZ, D.C.; UBEDA ONTIVEROS, J.M. Y GONZALEZ CASTRO, J. (1983a). Fluctuations annuelles des populations de phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Granade (Espagne). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58 (6): 625-632.

MORILLAS MARQUEZ, F.; GUEVARA BENITEZ, D.C.; UBEDA ONTIVEROS, J.M. Y GONZALEZ CASTRO, J. (1983b). Teratismos observados en *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1943) (Diptera, Phlebotomidae) capturados en España. *Rev. Ibér. Parasitol.* 43: 135-143.

MOUTOU, F. (1983). La leishmaniose en tant qu'exemple de methodologie en épidémiologie. *Epidémiol. Santé Anim.* 4: 5-16.

MUÑOZ, J.R.; VELILLA, J.; ARIÑO, M.D.; JIMENEZ, J.J.; AGUIRRE, J.; FUENTES, F. Y NAVARRO, M.L. (1984). Leishmaniosis visceral del adulto, a propósito de tres nuevos casos. *An. Med. Intern. (Madrid)* 1: 434-437. (En Lucientes y col., 1988).

MUÑOZ HOYOS, A.; MORILLAS MARQUEZ, F.; DUQUE ALCANA, G.; BAYES GARCIA, R.; RIVAS MORENO, F.J.; LOSCERTALES ABRIL, M. Y GIRON CARO, F. (1983). Aspectos epidemiológicos de la Leishmaniosis visceral en la provincia de Granada. *An. Esp. Pediatr.* 18 (3): 189-195.

NICOLI, R.M. Y QUILICI, M. (1965). Les phébotomes et les maladies humaines transmises par ces insectes en Corse. *Bull. Soc. Corse Biol. Hum.* 3: 3-44.

NIETO, C.G.; HABELA, M.; NAVARRETE, I.; REINA, D. Y REDONDO, E. (1990). Leishmaniosis in Cáceres (Spain): renal funtion in naturally infected dogs. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 (supl, 1): 362.

NIETO, C.G.; HABELA, M.; SERRANO, F.; REINA, D. Y NAVARRETE, I. (1989). Encuesta epidemiológica de la leishmaniosis canina en la comarca de Cáceres. Resumen VI Congr. Nac. y I Congr. Ibér. Parasitol. Cáceres: 196.

OLIVIER, M.; PROUIX, CH. Y TANNER, CH.E. (1989). Importance of limphokines in the control of multiplication and dispersion of *Leishmania donovani* within liver macrophages of resistant and susceptible mice. *J. Parasitol.* 75 (5): 720-727.

O.M.S. (1977). Le titrage avec immunoadsorbant lié à une enzyme (ELISA). *Bull. Organ. mond. Santé* 55 (5): 557-568.

O.M.S. (1984). Las leishmaniosis. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie Informes Técnicos, 701: 151pp.

PAGES, M.; BASTIEN, P.; VEAS, F.; ROSSI, V.; BELLIS, M.; WINCKER, P.; RIOUX, J.A. Y ROIZES, G. (1989). Chromosome size and number polymorphism in *Leishmania infantum* suggest amplification /deletion and possible genetic exchange. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 36 (2): 161-168.

PAMPIGLIONE, S.; LA PLACA, M. Y SCHLICK, G. (1974a). Studies on Mediterranean leishmaniasis. 1. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68: 349-359.

PAMPIGLIONE, S.; MANSON, P.; GUNGI, F.; PARENTI, A. Y CANESTRI, G. (1974b). Studies of Mediterranean Leishmaniosis. 2. Asymptomatic cases of Leishmaniosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68 (6): 447-453.

PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR, P.E.C.; LA PLACA, M.; BORGATTI, M. A. Y MUSOMECCI, S. (1975). Studies on Mediterranean leishmaniasis. 3: The leishmanin skin test in Kala-azar. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69: 60-68.

PAPPAS, M.G. (1986). Rapid serodiagnosis of parasitic infections by Dot-ELISA using "dipsticks". (Correspondence). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80 (6): 1006.

PAPPAS, M. (1988). Recent Application of the Dot-ELISA in Immunoparasitology. *Vet. Parasitol.* 29: 105-129.

PAPPAS, M.G.; BALLOU, W.R.; GRAY, M.R.; TAKAFUJI, E.T.; MILLER, R.N. Y HOCKMEYER, W.T. (1985a). Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34 (2): 346-354.

PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R.; CANNON, L. T., Sr. y HOCKMEYER, W. T. (1984a). Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): comparison with standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 14 (3/4): 239-249.

PAPPAS, M,G.; HAJKOWSKI, R.; DIGGS, C.L. Y HOCKMEYER, W.T. (1983a). Development of an antigen conservative enzyme immunmoassay (dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. (correspondence). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77 (3): 425-426.

PAPPAS, M.G.; HAJKOWSKI, R.; DIGGS, C.L. Y HOCKMEYER, W.T. (1985b). Disposable nitrocellulose filtration plates simplify the dot-ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. (Correspondence). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79 (1): 136.

PAPPAS, M. G.; HAJKOWSKI, R.; HOCKMEYER, W.T. (1983b). Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* 64 (1/2): 205-214.

PAPPAS, M.G.; HAJKOWSKI, R. Y HOCKMEYER, W.T. (1984b). Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33 (6): 1105-1111.

PAPPAS, M.G.; HAJKOWSKI, R.; TANG, D.B. Y HOCKMEYER, W.T. (1985c). Reduced false positive reactions in the dot-enzyme-linked immunosorbent assay for human visceral leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathology* 34 (3): 392-396.

PARROT, L. Y HABBIBI, A. (1946). Notes sur les Phlébotomes. LIV.- Formes anormales de *Phlebotomus minutus* var. *parroti* Adler y Theodor. *Arch. Inst. Pasteur Algér.* 24: 157-159.

PAVLOVSKY, E.N. (1966). *Natural nadality of transmissible diseases: whith special reference to the landscape epidemiology of the zooanthroponoses.* University of Illinois Press: Urbana. (Translated by F.K. Plous y N.D. Levine, ED.). (en Garnham, 1987).

PAZ, L. Y GUEVARA, L. (1990). Dot-ELISA for serodiagnosis of human hydatidosis. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 8 (supp. 2): 927.

PETERS, W. Y KILLICK-KENDRICK, R. (1987). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol. I y II.* Edit. Academic Press: pp.

PETROVIC, Z.; BORDJOSKY, A. Y SAVIN, Z. (1975). Les résultats de recherches sur le réservoir de *Leishmania donovani* dans une region endémique du kala-azar. *Proc. 2<sup>nd</sup> Europ. Multicoll. Parasit.*, Trogir, 97-98.

PIRES, C.A. (1984). Les phlébotomes du Portugal. I. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59 (5): 521-524.

PORTUS, M.; FISA., R.; SERRA, T.; GALLEGU, M. Y MORA, R. (1987a). Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. *Med. Vet.* 4 (11): 44-48.

PORTUS, M.; FISA, R.; SERRA, T.; RIERA, C.; MUÑOZ, C. Y PRATS, G. (1987b). Las técnicas de IFI y "Dot-ELISA" en el diagnóstico y control del Kala-azar autóctono. Resumen del *V Congr. Nac. de Parasitol.* Salamanca: 277-278.

PORTUS, M.; GALLEGU. J.; RIOUX, J. A.; PRATLONG, F.; MORENO, G.; FISA, R.; GALLEGU, M., MUÑOZ, C.; RIERA, C.; SANCHEZ, F. Y SERRA, T. (1989). Enzimatic heterogeneity among strains of

*Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniasis in Catalonia (Spain) *Rev. Ibér. Parasitol.* 49 (4): 287-289.

PORTUS, M.; RIOUX, J.A.; GALLEGO, J.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F. Y MORENO, G. (1986). La leishmaniose en Catalogne. A propos de l'identification enzymatique de neuf souches d'origine humaine et canine. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogenèse. Applicatios éco-épidémiologiques.* Rioux, J.A. Eds. IMEEE, Montpellier, 433-438.

POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S. Y GRAMICCIA, M. (1981a). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.* 38: 383-393.

POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S. Y GRAMICCIA, M. (1981b). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): V. Further isolation of *Leishmania* from *Rattus rattus* in the province of Grosseto. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 75 (4): 393-395.

PRATLONG, F. (1985). *Le pouvoir pathogène expérimental comme critère taxonomique du genre Leishmania Ross, 1903.* Tesis Doctoral Academie de Montpellier. Univ. des Sciences et Techniques du Languedoc: 157pp + A59.

PRATLONG, F.; PORTUS, M.; RISPAIL, P; MORENO, G., BASTIEN, P. Y RIOUX, J.A. (1989a). Presence simultanée chez le chien de deux zymodemes du complexe *L.infantum*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64 (4): 312-314.

PRATLONG, F.; RISPAIL, P.; MORENO, G.; LE FICHOUX, Y.; TOMMANSI, C.; PERIERES, J. Y RIOUX, J.A. (1989b). Leishmaniose cutanée a *Leishmania infantum* MON-24, observée à Grosse (Alpes-Maritimes) chez un enfant Tunissien. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64 (6): 506-509.

PRESWOOD, W.G. (1981). In *Membrane Filtration. Applications and Problems* Edit B.J. Duika. Marcel Dekker, New York. (En Tjseen, 1986).

QUILES MORA, J.; GARCIA DE LOMAS, J.; SANCHEZ PEDREÑO, J.; MARIN INIESTA, F. Y RODRIGUEZ GARCAI, F. (1979). Leishmaniasis. Un problema actual. *Rev. San. Hig. Púb.* 53 : 771-807.

QUILICI, M.; DUNAN, S. y RANQUE, J. (1968). L'immunofluorescence dans les leishmanioses. Comparaison avec la réaction de fixation du complément. *Med. Trop.* 28: 37-43.

QUILICI, M.; DUNAN, S. Y MARY, CH. (1989). La leishmaniose vicérale dans le sud-est de la France. *Sem. Hôp. Paris* 65 (35): 2155-2161.

RANQUE, J.; QUILICI, M. Y DUNAN, S. (1977). Les leishmanioses de la Région Provençale. Considerations épidémiologiques et écologiques. In: *Ecologie des Leishmanioses*. Coll. CNRS, n° 239: 285-293.

REED, S.G.; SHREFFLER, W.G.; BURNS, J.M., Jr.; SCOTT, J.M.; ORGE, M.G.; GHALIB, H.W.; SIDDIING, M. Y BADARO, R. (1990). An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43 (6): 632-639.

REYES MAGAÑA, A.; MORILLAS MARQUEZ, F.; VALERO LOPEZ, A.; GONZALEZ CASTRO, J.; BENAVIDES DELGADO, I. Y SANCHIS MARIN, M.C. (1988). Encuesta sobre la leishmaniosis canina en las comarcas naturales de la Provincia de Granada (Sur de España). *Rev. Ibér. Parasitol.* 48 (3): 233-240.

RIOUX, J.A.; ABBONENC, A. Y BAUDOY, J.P. (1965). Un cas de gynandromorphisme chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera, Psychodidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 1: 615-617.

RIOUX, J. A.; ALBARET, J. L.; HOUIN, J. P.; DEDET, J. P. Y LANOTTE, G. (1968a). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du Renard (*Vulpes vulpes* L.). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 43 (4): 421-428.

RIOUX, J.A.; CROSET, H. Y LANOTTE, G. (1977). Ecologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation. In: *Ecologie des Leishmanioses* Coll. CNRS n° 239: 295-305.

RIOUX, J.A.; CROSET, H.; MAISTRE, M. (1974). Un cas de gynandromorphisme chez *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1943) (Diptera, Psychodidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 49: 371-372.

RIOUX, J.A.; GOLVAN, Y.J.; CROSET, H.; HOUIN, R.; JUMINER, B. Y TOUR, S. (1967). Ecologie des Leishmanioses dans le Sud de la France. 1. Les Phlébotomes. (Echantillonnage-Ethologie). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 42 (6): 561-603.

RIOUX, J.A.; GOLVAN, Y.; CROSET, H.; HOUIN, R. y TOUR, S. (1968b). Enquête écologique sur les leishmanioses dans le sud de la France. *Bull. de l'INSERM* 23 (5): 1125-1164.

RIOUX, J.A.; GOLVAN, Y.J.; (avec la collaboration de CROSET, H.; TOUR, S.; HOUIN, R.; ABBONENC, E.; PETITDIDIER, M.; VOLLHARDT, Y.; DEDET, J.P.; ALBARET, J.L.; LANOTTE, G.; QUILICI, M.; MARTIN DUMAS, A.; MAISTRE, M.; BRES, A.; ROVIRALTA, T Y VILA, F. (1969). Epidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France. Institut National de Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Paris. *Monographie INSERM* 37: 223pp.

RIOUX, J.A.; GOLVAN, Y.J.; HOUIN, R.; CROSET, H. Y TOUR, S. (1970). Resultats d' une enquête ecologique sur le foyer leishmanien des Cevennes meridionales. *Rev. Medicine* 18: 1039-1052.

RIOUX, J.A.; GUILVARD, E.; GALLEGO, J.; MORENO, G.; PRATLONG, F.; PORTUS, M.; RISPAIL, P.; GALLEGO, M. Y BASTIEN, P. (1986a). *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d' une enquête en Catalogne (Espagne). En: *Leishmania. Taxonomie et phylogenèse. Applicatios éco-épidémiologiques*. Rioux, J.A. Eds. IMEEE, Montpellier, 439-444.

RIOUX, J.A.; JARRY, D.M.; LANOTTE, G.; MAAZOUN, R. Y KILLICK-KENDRICK, R. (1984). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 18. Identification enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, isolé de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 spontanément infesté en Cévennes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59 (4): 331-333.

RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; CROSET, H. Y DEDET, J.P. (1972a). Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 5. Pouvoir infestant comparé des diverses formes de leishmanioses canine vis-a-vis de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 47 (3): 413-419.

RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; MAAZOUN, R.; PERELLO, R. Y PRATLONG, F. (1980). *Leishmania infantum* Nicolle 1908, agent du bouton d'Orient autochtone propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrenees Orientals. *C.R. Acad. Sc. Paris* 291 :701-703.

RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; PERIERES, J. Y CROSET, H. (1973). Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 6.- Première mention de l'infestation spontanée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 48 (4): 519-522.

RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F.; DEREURE, J.; JARRY, D.; MORENO, G.; KILLICK-KENDRICK, R.; PERIERES, J.; GUILVARD, E.; BELMONTE, A. Y PORTUS, M. (1985). La leishmaniose cutanée autochtone dans le sud-est de la France. Résultats d' une enquête éco-épidémiologique dans les Pyrénées-Orientales. *Méd. Mal. Infect.* 11: 650-656.

RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P. Y PERIERES, J. (1990). Taxonomie of *Leishmania* use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65 (3): 111-125.

RIOUX, J.A.; LEGER, N.; HOUIN, R.; LANOTTE, G.; DENIAU, M. Y TASEI, J.P. (1972b). Premiers résultats d' une enquête épidémiologique en Corse. *Corse Mediterr. Med.* 18 (223): 89-100.

RIOUX, J.A.; MORENO, G.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F.; DEREURE, J. Y RISPAIL, P. (1986b). Two episodes of cutaneous leishmaniasis in man caused by different zymodemes of *Leishmania infantum* s.l. (correspondance). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80 (6): 1004-1005.

ROVIRA, A. (1990). *Sobre la fauna de flebotoms de l'area de Montserrat*. Tesina Licenciatura, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona: 231pp.

SACKS, D.L. Y PERKINS, P.V. (1984). Identification on an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417-1419.

SAFYANOVA, V.M. (1977). The principles of the characterization of foci of leishmaniasis. In: *Ecologie des Leishmaniasis* Coll. CNRS n° 239: 279-283.

SANCHEZ ACEDO, C.; LUCIENTES CURDI, J.; CASTILLO HERNANDEZ, J.A.; ESTRADA PEÑA, A. Y PERIBANEZ LOPEZ, M.A. (1987). Distribución de las poblaciones de flebotomos (Diptera: Phlebotomidae) por zonas, dentro del foco de leishmaniasis de Zaragoza. Resumen V Congr. Nac. de Parasitol. Salamanca: 107-108.

SANCHEZ BOTIJA, C. (1936). Leishmaniasis canina. Algunas observaciones sobre los caracteres generales del foco endémico de Madrid. *Trabajos del Instituto de Biología Animal*. 2: 70-87.

SANCHEZ BOTIJA, C. (1947). La leishmaniasis canina y su profilaxis en España. *Rev. Sanid. Vet.* 2 (7): 530-553.

SANCHIS MARIN, M.C.; MORILLAS MARQUEZ, F.; MARTIN SANCHEZ, J.; ACEDO SANCHEZ, C. Y GONZALEZ CASTRO, J. (1991). La leishmaniasis canina en la provincia de Almería: Estudio del reservorio canino y del agente vectorial en la zona del nordeste. ICASEP I, Valencia: 308.

SANCHIS MARIN, M.C.; VILLEGAS, G. Y MORILLAS MARQUEZ, F. (1986). Flebotomos y leishmaniasis en la provincia de Almería. *Rev. San. Hig. Púb.* 60 : 1131-1139.

SANTOS GOMES, G.M.; VALVERDE, D.M.; SILVA PEREIRA, M.C.D. Y ABRANCHES, P. (1990). Description of a *Trypanosoma crocidurae* isolated on the shrew *Crocidura russula* in Portugal. Resumen *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 8 (sup, 1): 329.

SCOTT, J.M.; SHREFFLER, W.G.; GHALIB, H.W.; EL ASAD, A.; SIDDIG, M.; BADARO, R. Y REED, S.G. (1991). A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44 (3): 272-277.

SEGUI PUNTAS, M.G. (1991). *Estudio epidemiológico de la leishmaniasis en la isla de Menorca*. Tesis Doctoral, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona: 289pp.

SEGUI, M.G.; VALLS, D.; FISA, R.; GALLEGU, M. Y PORTUS, M. (1990). Estandarización de las condiciones de conservación y elución de muestras de sangre recogidas en papel de filtro para el estudio serológico de la leishmaniosis. *Rev. Ibér. Parasitol.* 50 (3-4): 323-328.

SERRA, T.; FISA, R.; PORTUS, M.; CANUT, L. Y GALLEGU, M. (1987). Estudio comparativo de las técnicas de IFI, ELISA y Dot-ELISA en el diagnóstico de la leishmaniosis canina. Resumen V Congr. Nac. de Parasitol. Salamanca: 299-300.

SHERLOCK, I.A. (1958). Anomalías de *Phlebotomus longipalpis* Lutz y Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae). *Rev. Brasil. Biol.* 18: 433-437.

SRIVASTAVA, L. Y SINGH, V.K. (1988). Diagnosis of Indian Kala-azar by dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA). *Ann. Trop. Med. Hyg.* 82 (4): 331-334.

TELLEZ GIRON, E.; RAMOS, M.C.; DUFOUR, L.; ALVAREZ, P. Y MONTANTE, M. (1987). Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37 (1): 169-173.

TIJSEEN, P. (1986). *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* Vol. 15. Edit. Burdon, R.H. y Vanknippenberg, P.H. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford: 548 pp.

VAN WEERMEN, B.K. Y SCHUURS, A.H.W.M. (1971). Immunoassay using antigen enzyme conjugates. *FEBS Letters* 15: 232. (En Tijseen, 1986)

VATTIER-BERNARD, G. (1975). Un cas de gynandromorphisme chez *Phlebotomus bedfordi* Newstead, 1914 (Diptera, Psychodidae). *Cahiers ORSTOM, Serie d'Entomol. Med. et Parasitol.* 13: 115-116.

VATTIER-BERNARD, G. Y TROUILLET, J. (1983). Phlébotomes du mayombe congolais (Diptera, Psychodidae). Etude phénologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58 (4): 391-401.

VIDOR, E.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DUBREUIL, N.; BISSUEL, G.; MOREAU, Y. Y RIOUX, J.A. (1991). Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Etude d'une cohorte en région cévenole. *Pratiqu méd. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.* 26 (2): 133-137.

WALLIS, C.; MELNICK, J.L. Y GERBA, C.P. (1979). *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 413. (En Tijssen, 1986).

ZHENG HUI-JUN; TAO ZHENG-HOU; CHENG WENG FENG Y PIESSENS, W.F. (1990). Comparison of Dot-ELISA with sandwich-ELISA for the detection of circulating antigens in patients with

brancoftian filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42 (6): 546-549.

ZIVKOVIC, V. Y MISCEVIC, Z. (1973). Identification of blood meals of sandflies (Diptera: Psychodidae). *J. Parasitol.* 59 (6): 1150-1151.

ZIVKOVIC, V.; MOVSESIJAN, M.; MISCEVIC, Z. Y BOROJEVIC, D. (1971). Detection of the origen of blood meals in sandflies (Diptera: Psychodidae). *Acta Vet. Beograd.* 21 (3): 129-134.

X. A N E X O

ANEXO 1.

Resultados obtenidos al estudiar en paralelo 70 muestras, mediante la técnica serológica IFI y la técnica "Dot-ELISA".

IFI	"Dot-ELISA"
neg	neg
1/160	1/800
1/10	neg
neg	1/100
neg	1/100
1/160	1/800
neg	1/100
1/20	1/200
1/10	1/200
1/160	1/800
1/40	1/200
1/20	1/200
1/20	1/200
1/80	1/800
1/40	1/400
1/40	1/400
1/80	1/400
1/40	1/400
1/80	1/400
1/160	1/800
1/160	1/1600
1/10	neg
neg	neg
1/20	neg
1/10	neg
1/20	1/100

..... /.....

...../.....

IFI	"Dot-ELISA"
neg	1/100
1/20	1/100
1/640	1/6400
1/20	1/200
1/40	1/200
1/80	1/400
1/320	1/800
1/640	1/800
1/640	1/1600
1/10	1/200
1/640	1/6400
1/160	1/3200
1/10	neg
1/10	neg
1/20	neg
>1/640	>1/6400
neg	neg
1/10	1/100
1/80	1/800
1/20	1/200
neg	1/100
neg	1/100
1/10	1/100
1/20	1/200
neg	1/100
1/20	1/200
neg	neg
1/10	1/100
1/320	1/800
1/80	1/1600

...../.....

...../.....

---

IFI	"Dot-ELISA"
1/160	1/800
1/80	1/800
1/80	1/800
1/320	1/3200
1/320	1/800
1/160	1/800
1/160	1/800
1/320	1/800
1/640	1/3200
1/160	1/3200
1/640	1/6400
1/640	1/6400
1/640	1/6400
neg	neg

---

ANEXO 2.

Resultados obtenidos mediante la técnica "Dot-ELISA", al estudiar en paralelo muestras de sangre total recogidas sobre papel Whatman n° 3 y muestras de suero.

"Dot-ELISA" Sangre total	"Dot-ELISA" Suero
1/100	1/200
neg	1/200
1/100	1/100
1/200	1/200
1/100	1/200
1/100	neg
1/200	1/200
neg	neg
1/200	1/200
neg	neg
neg	neg
1/400	1/400
neg	neg
neg	neg
neg	neg
1/400	1/400
1/6400	1/6400
neg	neg

...../.....

"Dot-ELISA" Sangre total	"Dot-ELISA" Suero
1/800	1/1600
1/800	1/3200
1/6400	1/6400
1/800	1/800
1/800	1/800
1/800	1/800
1/800	1/800
1/200	1/200
1/400	1/800
1/400	1/800
1/400	1/400
1/200	1/200
1/200	1/400
1/400	1/400
1/100	1/200
1/200	1/200
1/200	1/400
neg	neg
1/100	1/100
1/100	1/100
neg	neg
1/200	1/200
1/800	1/800
1/800	1/800
1/800	1/800
1/800	1/800
1/100	1/200
1/100	1/200

...../.....

...../.....

"Dot-ELISA" Sangre total	"Dot-ELISA" Suero
1/100	1/200
neg	1/100
neg	1/100
1/400	1/400
1/800	1/800
1/800	1/800
1/3200	1/6400
1/400	1/800

ANEXO 3.

Animales con títulos serológicos elevados ( $\geq 1/800$ ) controlados en el período de un año

N°	Título serológico		Sintomatología	
	1°Control	2°Control	1°Control	2°Control
604	1/6400	exitus	++	exitus
193	1/800	1/800	++	++
196	1/800	1/800	0	0
476	1/6400	exitus	++	exitus
750	1/6400	1/6400	+	++
514	1/6400	1/3200	++	++
557	1/800	1/3200	+	+
101	1/6400	1/6400	0	0
104	1/800	1/800	+	++
111	1/3200	exitus	++	exitus
114	1/800	1/1600	0	0
118	1/3200	exitus	+	exitus
220	1/1600	1/1600	++	++
236	1/800	1/1600	0	+
240	1/1600	exitus	++	exitus
875	1/1600	exitus	0	exitus
876	1/800	1/800	+	+
931	1/3200	1/3200	+	+
946	1/3200	1/3200	+	++
951	1/1600	exitus	0	exitus
964	1/800	1/800	+	++
968	1/800	1/800	++	++
977	1/6400	exitus	++	exitus

...../.....

...../.....

N°	Título serológico		Sintomatología	
	1°Control	2°Control	1°Control	2°Control
131	1/6400	exitus	++	exitus
710	1/1600	1/1600	++	++
681	1/800	1/800	+	+
689	1/800	1/1600	0	+
690	1/800	1/400	+	+
728	1/800	1/1600	++	++
733	1/3200	exitus	++	exitus
736	1/800	1/3200	+	++
739	1/800	1/800	+	++
743	1/800	exitus	++	exitus
671	1/800	1/800	+	0
826	1/1600	exitus	0	exitus
829	1/6400	1/6400	+	++
836	1/6400	1/6400	+	++
847	1/6400	exitus	0	exitus
850	1/800	exitus	0	exitus
853	1/6400	1/6400	0	+
854	1/800	1/800	0	+
871	1/800	1/800	0	+
4	1/6400	exitus	0	exitus
19	1/800	1/800	0	+
30	1/1600	exitus	+	exitus
45	1/6400	exitus	++	exitus
409	1/800	1/1600	0	0
412	1/6400	exitus	++	exitus
307	1/3200	1/3200	0	0
310	1/3200	exitus	0	exitus
429	1/800	1/1600	+	++
437	1/800	exitus	++	exitus

...../.....

...../.....

N°	Título serológico		Sintomatología	
	1°Control	2°Control	1°Control	2°Control
444	1/800	1/800	+	+
445	1/800	1/400	+	+
446	1/800	1/400	+	+
448	1/6400	exitus	++	exitus
449	1/800	1/400	+	++
450	1/800	1/200	0	0
452	1/800	1/1600	0	++
458	1/800	1/800	+	++
459	1/1600	1/1600	+	++
461	1/6400	exitus	++	exitus
364	1/800	1/800	0	0
371	1/800	1/800	0	0
1037	1/800	1/1600	++	++
1048	1/1600	exitus	++	exitus
1054	1/6400	1/6400	++	+
1057	1/3200	exitus	++	exitus

N°: número de identificación del animal

0: asintomático; +: oligosintomático; ++: sintomático

ANEXO 4.

Animales con títulos serológicos bajos ( $\leq 1/400$ ) y negativos controlados en un período de 6 meses.

N°	Título serológico		Sintomatología	
	1°Control	2°Control	1°Control	2°Control
608	1/400	1/1600	++	++
625	neg	neg	0	0
626	1/100	1/400	0	0
628	1/400	1/400	+	+
634	1/400	1/800	+	+
747	1/200	1/200	0	0
539	1/400	1/400	+	++
540	1/400	1/400	0	+
117	neg	neg	0	0
118	1/400	1/3200	++	+
217	1/400	1/1600	+	+
218	1/400	1/400	0	0
219	1/400	1/1600	++	++
222	1/400	1/800	0	0
235	1/200	1/200	+	++
238	1/400	1/200	++	+
241	neg	1/200	+	+
243	1/400	1/800	0	0
921	1/400	1/400	0	0
937	1/400	1/400	0	1
967	1/400	1/400	0	1
977	1/400	1/6400	0	++
682	1/400	1/200	0	0
683	1/400	1/800	+	+

...../.....

...../.....

N°	<u>Título serológico</u>		<u>Sintomatología</u>	
	1°Control	2°Control	1°Control	2°Control
691	1/400	1/400	+	+
641	1/400	1/400	0	+
652	1/400	1/200	+	+
668	1/400	1/400	+	+
8	1/100	1/100	0	0
9	1/200	1/200	0	+
14	neg	neg	0	0
15	1/400	1/200	+	+
18	neg	neg	+	+
22	1/200	1/200	0	+
30	1/200	1/1600	0	+
39	1/200	1/200	0	0
52	1/100	1/100	++	++
53	1/200	1/200	0	0
54	1/100	1/100	0	0
402	1/200	1/200	0	++
423	1/200	1/200	0	0
435	1/400	1/800	+	+
450	1/100	1/200	0	0
451	1/200	1/100	0	0
366	1/400	1/400	0	0
373	1/400	1/400	0	0
386	1/200	1/200	+	++
1035	1/100	1/200	0	0
1039	1/200	1/200	++	++
1040	1/100	1/100	0	+
1042	1/100	1/200	0	+
1043	neg	1/100	0	0

N°: número de identificación del animal

0: asintomático; +:oligosintomático; ++:sintomático

ANEXO 5.

Reactivos

-PBS: Tampón fosfato

(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O ..... 14 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1.5 g  
NaCl ..... 42.5 g  
H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. ... 5000 ml  
Ajustar a pH:7.2

-TS: Tampón Tris-salino

Tris (hidroximetil) aminometano .. 2.4 g  
NaCl ..... 7.5 g  
H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. .... 1 1  
Ajustar a pH:7.6 con ácido HCl concentrado

-TS leche 5%: Solución Tris-salino leche 5%

Leche descremada (Régilait 0.8% materia grasa) al 5%  
en Tris-salino.

-TST: solución Tris-salino-tween

Tween 20 al 0.05% en Tris-salino

-TST-leche 1%

Leche descremada (Régilait 0.8% materia grasa) al 1%  
en Tris-salino-tween.

-TS 500mM

Tris (hidroximetil) aminometano .. 2.4 g  
NaCl ..... 29.2 g  
H<sub>2</sub>O destilada c.s.p. .... 1 l  
Ajustar a pH: 7.6 con ácido HCl concentrado

-Substrato

Solución metanol/cloronaftol..... 2 ml  
TS 500mM ..... 8 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... 4 µl

-Solución metanol/cloronaftol

4 clor-1-naftol (Merck) ..... 60 mg  
Metanol anhidro ..... 20 ml

Conservar en frasco color topacio a 4°C

-Líquido de Hoyer (para el montaje de los flebotomos)

Agua destilada ..... 50 g  
Goma arábiga ..... 30 g  
Hidrato de cloral ..... 200 g  
Glicerina ..... 20 g

Mezclar los ingredientes a temperatura ambiente y en el orden indicado hasta su total disolución.

Filtrar para eliminar los restos insolubles.

ANEXO 6.

Pruebas estadísticas utilizadas

-Comparación de proporciones

Prueba de conformidad de  $\chi^2$

Comparación de porcentajes

-Pruebas no paramétricas

Prueba "T" de Wilcoxon (comparación de tendencia central en dos muestras con datos apareados).

Coefficiente  $\tau$  de concordancia de Kendall

Estas pruebas se ha realizado con ayuda de un paquete estadístico SPSS/PC + V.3.1

-Cálculo de la TGM (inversa de la media geométrica de los títulos de anticuerpos)

$$\text{TGM: antilog de } \frac{\sum f(\log x)}{n}$$

x: denominador del título

f: nº de sueros de cada título