

UNIVERSITAT
DE
BARCELONA



FACULTAT
DE
FARMÀCIA

TESINA

EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA
EN DOS LOCALIDADES DEL PRIORAT (TORROJA
Y MARGALEF)

por

SOLEDAD CASTILLEJO GONZALEZ

Directoras:

MONTSERRAT GÁLLEGO CULLERÉ

*Prof. Titular de Parasitología del Departament de Microbiologia i Parasitologia
Sanitàries de la Universitat de Barcelona*

y

ROSER FISA SALADRIGAS

*Prof. Titular Interina de Parasitología del Departament de Microbiologia i
Parasitologia Sanitàries de la Universitat de Barcelona*

Barcelona, Septiembre de 1995

1383

27.10.95

El presente trabajo ha sido realizado en la Unitat de Parasitologia, del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, bajo la co-dirección de las Dras. Montserrat Gállego Culleré y Roser Fisa Saladrigas.

Barcelona, Septiembre de 1995



Autorizan su presentación

las co-directoras



La realización de esta Tesina no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas a las cuales quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, y de forma muy especial, a la Dra. MONTSERRAT GÁLLEGO CULLERÉ, Profesora Titular de la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia, por su valiosa contribución al presenta trabajo, tanto en el terreno profesional, por su gran conocimiento sobre el tema, como en el terreno personal, por su gran ayuda y paciencia.

A la Dra. ROSER JOSA SALADRIGAS, Profesora Titular Interina de la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia, por haber aceptado la co-dirección de la Memoria y su valiosa aportación en el campo de la leishmaniosis canina.

A la Dra. MONTSERRAT PORTÚS VINYETA, Catedrática de Parasitología de la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia, por habernos acogido poniendo a nuestra disposición su amplia experiencia en el campo de la leishmaniosis y por la revisión crítica de la presente Memoria.

Al Dr. JAUME GÁLLEGO BERENGUER, Catedrático Jubilado de Parasitología de la Facultat de Farmàcia quien, de forma totalmente desinteresada, nos ha aportado sus conocimientos en el campo de la Parasitología, ha realizado la iconografía que se adjunta y ha efectuado la revisión crítica del presente trabajo.

A todos los miembros del equipo de Leishmaniosis, en especial a la Dra. CRISTINA RIVERA, DOLORES VALLS, M^a JESÚS AJSA, MARJA DE COLMENARES y SARA TORRAS, por su colaboración en el trabajo de campo y su apoyo moral durante los años que hemos trabajado juntas.

Al Dr. EZEQUIEL MARTÍNEZ ORTEGA, Profesor Titular del Departamento de Zoología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, por sus valiosos comentarios sobre la fenología de los flebotomos.

A la Dra. ELSANNE GUSLVARD, del Laboratoire d'Écologie Médicale de la Facultad de Medicina de la Universidad de Montpellier, por su aportación en todo lo que respecta a los flebotomos.

A los Veterinarios de la comarca del Priorat, que tan amablemente han colaborado en la obtención de muestras del reservorio canino, y a los habitantes de dicha comarca por su predisposición para ayudarnos a realizar nuestro trabajo.

A todos los compañeros del Laboratorio de Parasitología que siempre se interesaron por mi trabajo y me apoyaron en todo momento.

Finalmente quiero agradecer a mi familia por toda la paciencia, cariño y apoyo que me han prestado durante todo el tiempo que ha durado el trabajo.

<u>ÍNDICE</u>	<u>Pág.</u>
I.- <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
I.1.- LAS LEISHMANIOSIS	1
I.1.1.- <u>EPIDEMIOLOGÍA DE LAS LEISHMANIOSIS EN LA CUENCA MEDITERRÁNEA OCCIDENTAL EUROPEA</u>	4
I.1.1.1.- EL AGENTE PATÓGENO	7
I.1.1.2.- EL RESERVORIO	10
A) <i>RESERVORIO CANINO</i>	10
B) <i>OTROS RESERVORIOS</i>	11
I.1.1.3.- EL VECTOR	13
I.2.- ANTECEDENTES DEL FOCO DE LEISHMANIOSIS DEL PRIORAT	15
I.3.- MOTIVACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	20
I.4.- PLAN DE TRABAJO	21
II.- <u>ZONA DE ESTUDIO</u>	22
III.- <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	29
III.1.- MATERIAL	30
III.1.1.- <u>EL RESERVORIO CANINO</u>	30
III.1.2.- <u>EL VECTOR: LOS FLEBOTOMOS</u>	33
III.2.- MÉTODOS	33
III.2.1.- <u>EL RESERVORIO CANINO</u>	33
III.2.1.1.- SISTEMA DE MUESTREO	33
III.2.1.2.- IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL	34
III.2.1.3.- TOMA DE MUESTRAS Y CONSERVACIÓN	36
III.2.1.4.- DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO: DOT-ELISA	37
III.2.1.5.- AISLAMIENTO DE CEPAS DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	44
A) <i>AISLAMIENTO DE LA MUESTRA</i>	44
Punción ganglionar	44
Punción de médula ósea	44
Biopsia cutánea	45
B) <i>CULTIVO DE LA MUESTRA</i>	46
III.2.2.- <u>EL FLEBOTOMO VECTOR</u>	47
III.2.2.1.- CAPTURA CON PAPEL ADHESIVO	48
III.2.2.2. - ENCLAVES Y ÉPOCA DE CAPTURA	48
III.2.2.3.- SUPERFICIE ESTUDIADA	51
III.2.2.3.- RECOLECCIÓN Y TOMA DE DATOS	53

III.2.2.4.- FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN	53
III.2.2.5.- MONTAJE	53
III.2.2.6.- IDENTIFICACIÓN	54
IV.- RESULTADOS	57
IV.1.- RESERVORIO CANINO	58
IV.1.1.- <u>TORROJA</u>	58
IV.1.1.1.- DISTRIBUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS Y PREVALENCIA ...	60
IV.1.1.2.- MEDIA GEOMÉTRICA DE LA INVERSA DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS Y TÍTULO ARITMÉTICO MEDIO	61
IV.1.1.3.-RELACIÓN DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO/DIAGNÓSTICO CLÍNICO	62
IV.1.1.4.- EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE LA ENFERMEDAD E INCIDENCIA	64
IV.1.1.5.- EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA	66
IV.1.1.6.- AISLAMIENTO DE CEPAS DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> DEL RESERVORIO CANINO	67
IV.1.2.- <u>MARGALEF</u>	69
IV.2.- FLEBOTOMO VECTOR	71
IV.2.1.- <u>TORROJA</u>	71
IV.2.1.1.- ESTUDIO CUALITATIVO: RIQUEZA ESPECÍFICA	71
IV.2.1.2.- ESTUDIO CUANTITATIVO	72
A) ABUNDANCIA	72
B) DENSIDAD	73
C) FENOLOGÍA	74
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	75
<i>Phlebotomus ariasi</i>	77
<i>Sergentomyia minuta</i>	79
<i>Phlebotomus sergenti</i> y <i>Phlebotomus papatasi</i>	81
IV.2.1.3.- GINANDROMORFOS DE <i>PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS</i>	81
A) GINANDROMORFO MASCULOIDE	82
B) GINANDROMORFO FEMINOIDE	82
IV.2.2.- <u>MARGALEF</u>	84
IV.2.2.1.-ESTUDIO CUALITATIVO: RIQUEZA ESPECÍFICA	84
IV.2.2.2.-ESTUDIO CUANTITATIVO	84
A) ABUNDANCIA	85
B) DENSIDAD	85
C) FENOLOGÍA	86
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	86

<i>Phlebotomus ariasi</i>	88
<i>Sergentomyia minuta</i>	90
<i>Phlebotomus sergenti</i> y <i>Phlebotomus papatasi</i>	92
V.- DISCUSIÓN	93
V.1.- RESERVORIO CANINO	94
V.1.1.- <u>DISTRIBUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS Y PREVALENCIA</u>	94
V.1.2.- <u>RELACIÓN DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO/DIAGNÓSTICO CLÍNICO</u>	96
V.1.3.- <u>EVOLUCIÓN SEROLÓGICA Y CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD E INCIDENCIA</u>	97
V.1.4.- <u>AISLAMIENTO DE CEPAS DE LEISHMANIA</u>	99
V.2.- FLEBOTOMOS VECTORES	102
V.2.1.- <u>ANÁLISIS CUALITATIVO</u>	102
V.2.2.- <u>ANÁLISIS CUANTITATIVO</u>	103
A) <u>ABUNDANCIA</u>	105
B) <u>DENSIDAD</u>	108
C) <u>FENOLOGÍA</u>	109
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	111
<i>Phlebotomus ariasi</i>	113
<i>Sergentomyia minuta</i>	114
V.3.- GINANDROMORFISMO DE <i>PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS</i>	115
V.4.- CONSIDERACIONES EPIDEMIOLÓGICAS	117
VI.- CONCLUSIONES	125
VII.- BIBLIOGRAFÍA	128
VIII.- ANEXO	146
ANEXO 1.- RELACIÓN DE LOS PERROS ANALIZADOS	147
ANEXO 2.- PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACIÓN	211
ANEXO 3.- PROTOCOLO DEL CULTIVO EN MASA	214
ANEXO 4.- REACTIVOS	215
ANEXO 5.- OBTENCIÓN DE LA DILUCIÓN 1/100 A PARTIR DE LA SANGRE EMBEBIDA EN PAPEL WHATMAN Nº 3	217

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURASPág.**Tablas**

Tabla 1.- Distribución por edades de los enfermos de Kala-azar (1925-1983), expresado en porcentajes (tomado de 31).....	5
Tabla 2.- Zimodemas de <i>L. infantum</i> aislados del hombre en el foco europeo del mediterráneo occidental	7
Tabla 3.- Zimodemas de <i>L. infantum</i> aislados del reservorio canino en el foco europeo del mediterráneo occidental	8
Tabla 4.- Zimodemas de <i>L. infantum</i> aislados de los flebotomos vectores en el foco europeo del mediterráneo occidental	9
Tabla 5.- Prevalencia de la LVu en distintos focos europeos	12
Tabla 6.- Prevalencia de la leishmaniosis en ratas	13
Tabla 7.- Especies vectoras de <i>L. infantum</i> en los países europeos de la cuenca mediterránea (aislamiento del parásito)	14
Tabla 8.- Prevalencia de la LCa en las distintas localidades del Priorat (tomado de 105)	16
Tabla 9.- LCa y sus vectores según las distintas áreas del Priorat (100 Km ²) (tomado de 55)	18
Tabla 10.- LCa y sus vectores según los distintos niveles altitudinales (tomado de 55)	18
Tabla 11.- Prevalencia de la LCa y densidad de los flebotomos vectores en las localidades de Torroja y Margalef (tomado de 55)	20
Tabla 12.- Temperaturas máxima, mínima y media registradas en las localidades de Torroja y Margalef durante el periodo de estudio	27
Tabla 13.- N° de habitantes en las localidades de Torroja y Margalef desde 1990 hasta 1995	28
Tabla 14.- N° de perros estudiados y n° de muestras analizadas en las localidades de Torroja y Margalef	30
Tabla 15.- Distribución temporal de los animales analizados.....	30
Tabla 16.- Seguimiento de los perros en la localidad de Torroja	31
Tabla 17.- Seguimiento de los perros en la localidad de Margalef	32
Tabla 18.- Periodos de captura	51
Tabla 19.- Superficie estudiada (m ²) para la captura de flebotomos	52
Tabla 20.- LCa en la población de Torroja	59

Tabla 21.- Distribución de los títulos de Ac anti- <i>Leishmania</i> en los perros de Torroja en los tres periodos estudiados	60
Tabla 22.- Prevalencia de la LCa en los tres periodos estudiados (Torroja)	60
Tabla 23.- Valores de TGM y TAM en el municipio de Torroja	62
Tabla 24.- Resultados serológicos Dot-ELISA/sintomatología (Torroja)	63
Tabla 25.- Relación diagnóstico serológico/diagnóstico clínico (Torroja)	63
Tabla 26.- Evolución de la LCa en la población de Torroja	64
Tabla 27.- Evolución serológica de la LCa en el periodo de 1 año (Torroja)	65
Tabla 28.- Variación significativa de la tasa de Ac (Torroja)	65
Tabla 29.- Evolución clínica de la LCa en Torroja	67
Tabla 30.- Resultados de los cultivos de <i>Leishmania</i> de distintas muestras del reservorio canino (Torroja)	68
Tabla 31.- LCa en la población de Margalef	69
Tabla 32.- Número de flebotomos capturados y distribución por sexos en la localidad de Torroja	72
Tabla 33.- Abundancia de los flebotomos en la localidad de Torroja	73
Tabla 34.- Densidad de los flebotomos (Torroja) (Sup.: 24,28 m ²)	73
Tabla 35.- Densidad/porcentaje de machos de <i>P. perniciosus</i> -Torroja	76
Tabla 36.- Densidad/porcentaje de machos de <i>P. ariasi</i> -Torroja	78
Tabla 37.- Densidad/porcentaje de machos de <i>S. minuta</i> -Torroja	80
Tabla 38.- Densidad/porcentaje de machos de <i>P. sergenti</i> y <i>P. papatasi</i> en Torroja	81
Tabla 39.- Número de flebotomos capturados y distribución por sexos	84
Tabla 40.- Abundancia de los flebotomos en la localidad de Margalef	85
Tabla 41.- Densidad de los flebotomos (Margalef) (Sup.: 32,52 m ²)	86
Tabla 42.- Densidad/porcentaje de machos de <i>P. perniciosus</i> -Margalef	87
Tabla 43.- Densidad/porcentaje de machos de <i>P. ariasi</i> -Margalef	89
Tabla 44.- Densidad/porcentaje de machos de <i>S. minuta</i> -Margalef	91
Tabla 45.- Densidad/porcentaje de machos de <i>P. sergenti</i> y <i>P. papatasi</i> en Margalef	92
Tabla 46.- Prevalencia de la LCa, en distintos focos europeos, mediante la técnica de IFI	95
Tabla 47.- Prevalencia de la LCa, en distintas localidades españolas, mediante la técnica de IFI	95
Tabla 48.- Relación entre el título serológico y el cultivo de <i>Leishmania</i> (Torroja)	100

Tabla 49.- Relación existente entre la sintomatología y el cultivo de <i>Leishmania</i> (Torroja)	101
Tabla 50.- Datos comparativos de la proporción de hembras de flebotomos en distintas zonas de España (método de captura: PA)	104
Tabla 51.- Datos comparativos de la proporción de hembras de flebotomos en distintas zonas de España según el tipo de trampas empleadas	105
Tabla 52.- Datos comparativos de la abundancia (%) de flebotomos en distintas zonas de España (método de captura: PA)	106
Tabla 53.- Datos comparativos de la abundancia (%) de flebotomos en distintas zonas de España según el tipo de trampas empleadas	107
Tabla 54.- Datos comparativos de la densidad de flebotomos en distintas zonas de la Península Ibérica (método de captura: PA)	109
Tabla 55.- Ginandromorfismo en flebotomos (tomado de 63 y 128)	116

Figuras

Fig. 1.- Tipos de ciclos epidemiológicos según Garnham	3
Fig. 2.- Co-infección <i>Leishmania</i> /VIH en Cataluña (tomado de 173)	6
Fig. 3.- División del Priorat en áreas (tomado de 55)	17
Fig. 4.- El Priorat, localización de la comarca en la provincia de Tarragona ..	23
Fig. 5.- El Priorat y sus límites	24
Fig. 6.- El Priorat, sectores de la comarca	25
Fig. 7.- Modelo de ficha utilizada para la recogida de los datos	35
Fig. 8.- Hoja de la base de datos	35
Fig. 9.- Extracción de sangre de la vena cefálica	36
Fig. 10 a.- Aparato Bio-Dot utilizado	39
Fig. 10 b.- Esquema y montaje del aparato Bio-Dot	39
Fig. 11.- Modelo de registro de las placas de NC	40
Fig. 12.- Esquema de disposición de los controles y sueros en el Dot-ELISA, indicando que dilución corresponde a cada columna	43
Fig. 13.- Placa revelada de Dot-ELISA	43
Fig. 14.- Punción ganglionar	45
Fig. 15.- Papel adhesivo, con flebotomos capturados	47
Fig. 16.- Estación 1 (Torroja)	49
Fig. 17.- Estación 2 (Torroja)	49
Fig. 18.- Estación 3 (Margalef)	50
Fig. 19.- Esquema del montaje de los flebotomos	54

Fig. 20 a.- Clave de identificación de los flebotomos machos (tomado de 61)	55
Fig. 20 b.- Clave de identificación de los flebotomos hembras (tomado de 61)...	56
Fig. 21.- Fenología de <i>P. perniciosus</i> en la localidad de Torroja	76
Fig. 22.- Fenología de <i>P. ariasi</i> en Torroja	78
Fig. 23.- Fenología de <i>S. minuta</i> en Torroja	80
Fig. 24.- Ginandromorfos de <i>P. perniciosus</i> : ejemplar masculino (18a) y ejemplar femenino (18b) (tomado de 62)	83
Fig. 25.- Fenología de <i>P. perniciosus</i> en la localidad de Margalef	87
Fig. 26.- Fenología de <i>P. ariasi</i> en la localidad de Margalef	89
Fig. 27.- Fenología de <i>S. minuta</i> en la localidad de Margalef	91
Fig. 28.- Mapa de distribución de los flebotomos en España (modificado de 61 y 70)	102
Fig. 29.- Fenología de <i>P. perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> y <i>S. minuta</i> en relación con la temperatura (Torroja)	110
Fig. 30.- Fenología de <i>P. perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> y <i>S. minuta</i> en relación con la temperatura (Margalef)	111
Fig. 31.- Comparación de la actividad de <i>P. perniciosus</i> en Torroja y Margalef	112
Fig. 32.- Comparación de la actividad de <i>P. ariasi</i> en Torroja y Margalef	114
Fig. 33.- Comparación de la actividad de <i>S. minuta</i> en Torroja y Margalef	115
Fig. 34.- Densidad de las especies vectoras en Torroja y Margalef	119
Fig. 35.- Periodo de transmisión de la leishmaniosis en Torroja	122
Fig. 36.- Periodos de transmisión de la leishmaniosis en Margalef	123

ABREVIACIONES

NM:	Nuevo Mundo
VM:	Viejo Mundo
LH:	Leishmaniosis humana
LC:	Leishmaniosis cutánea
LMC:	Leishmaniosis mucocutánea
LV:	Leishmaniosis visceral
LCa:	Leishmaniosis canina
LVu:	Leishmaniosis vulpina
ZM:	Zimodema
MON:	Montpellier (Lab. d'Écologie Médicale et Pathologie Parasitaire)
LEM:	Laboratoire d'Écologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Montpellier
GR:	Granada, Lab. Parasitología, Fac. Farmacia
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida
ADVP:	Drogodependientes
TGM:	Media geométrica de la inversa de los títulos de anticuerpos
TAM:	Título aritmético medio
ELISA:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IFI:	Inmunofluorecencia Adquirida
Ac:	Anticuerpo
Ag:	Antígeno
NC:	Membrana de nitrocelulosa
PBS:	Tampón fosfato
TS:	Tris-salino
TST:	Tris-salino-tween
Prot-A:	Proteína A
PO:	Peroxidasa
4C1N:	4-cloro-1-naftol
NNN:	Medio de cultivo Novy, McNeal y Nicolle
CCS:	Medio de cultivo corazón-cerebro-sangre
UI:	Unidades internacionales
TL:	Trampa de luz para la captura de flebotomos
CDC:	Trampa del Center of Disease Control para la captura de flebotomos
PA:	Papeles adhesivos para la captura de flebotomos

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- LAS LEISHMANIOSIS

Las leishmaniosis constituyen un conjunto de parasitosis, con afectación visceral y tegumentaria, de distribución cosmopolita, estando únicamente ausentes en Australia y la Antártida.

La OMS considera que son endémicas en 82 países (61 del Viejo Mundo-VM y 21 del Nuevo Mundo-NM) (48), mientras que otros autores consideran que 97 países las sufren o son sospechosos de hacerlo (22).

Se estima que, en todo el mundo, unos 350 millones de personas están expuestos a contraer la enfermedad y que unos 12 millones la padecen. Por otro lado, se calcula que las pérdidas por discapacidad en el conjunto de la población afectada son de 2 millones (212).

En España, la incidencia anual de la leishmaniosis humana (LH) se sitúa en 0,3 casos por 100.000 habitantes. Sin embargo, la incidencia real debe ser el doble, ya que la subdeclaración es importante, fundamentalmente en los casos de leishmaniosis cutáneas (LC), a pesar de ser Enfermedad de Declaración Obligatoria desde 1982 (15).

Están causadas por protozoos del género *Leishmania* que se localizan y multiplican, bajo el estadio de amastigota, en las células del sistema retículo-endotelial de mamíferos y reptiles sauriomorfos. Su ciclo biológico se completa con el concurso de hospedadores invertebrados, dípteros nematóceros de la familia Psychodidae subfamilia Phlebotominae, en cuyo tubo digestivo el parásito, bajo las formas promastigota y paramastigota, se multiplica extracelularmente.

Este ciclo biológico común presenta distintas modalidades epidemiológicas, dependiendo del tipo de hospedador vertebrado. Esencialmente, las leishmaniosis son zoonosis en las que el hombre se ha introducido, más o menos accidentalmente, en su ciclo biológico. Garnham (68) establece tres tipos epidemiológicos en función del hospedador vertebrado (Fig. 1):

1) **Ciclo enzoótico o primario**, el más primitivo, en el que diversas especies de mamíferos salvajes actúan como hospedadores vertebrados del parásito, con la introducción accidental del hombre en el ciclo bio-ecológico.

Ejemplos de ciclo primario serían las leishmaniosis muco-cutáneas (LMC) del NM, causadas por especies del complejo *Leishmania brasiliensis*, en las que los osos hormigueros, los perezosos y las zarigüeyas actúan como reservorios, o la leishmaniosis visceral (LV) de las zonas desérticas de Asia Central, causada por *Leishmania infantum*, en la que el chacal es a la vez el hospedador principal y reservorio de la afección humana.

2) **Ciclo zooantroponótico o secundario**, en el que la desaparición del reservorio salvaje del entorno humano permite la adopción, por parte del parásito, de animales domésticos susceptibles, entre ellos el perro, tal y como ocurre en nuestras leishmaniosis autóctonas debidas a *L. infantum*.

3) **Ciclo antroponótico o terciario**, en el que el reservorio animal desaparece y el hombre es el único hospedador vertebrado del parásito, tal y como sucede con la LV ocasionada por *Leishmania donovani* en la India y zonas meridionales de China y con la LC producida por *Leishmania tropica* en el Norte de Africa.

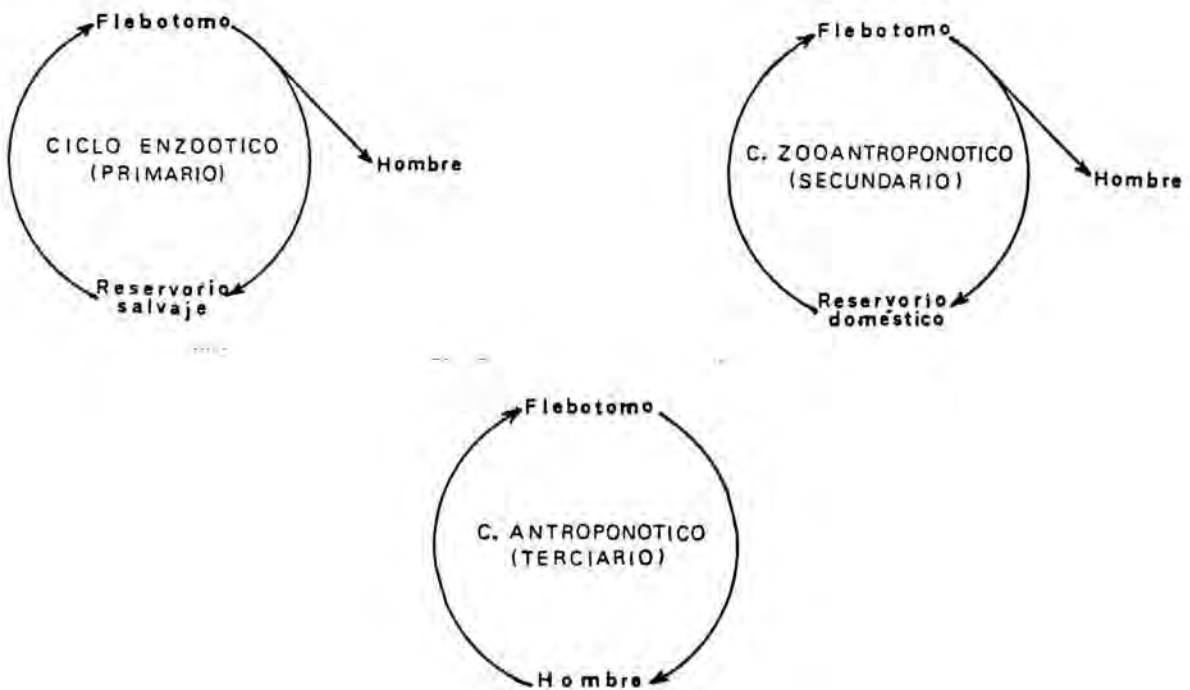


Fig. 1- Tipos de ciclos epidemiológicos según Garnham

En los focos naturales de infección existe un equilibrio constante entre el agente patógeno, los vectores, los hospedadores vertebrados y el entorno que los rodea. El conocimiento profundo de estos factores, su interrelación y su relación con el entorno permite entender como *Leishmania* logra circular y mantenerse, adaptándose a las condiciones del medio.

I.1.1.- EPIDEMIOLOGÍA DE LAS LEISHMANIOSIS EN LA CUENCA MEDITERRÁNEA OCCIDENTAL EUROPEA

En España, Francia, Italia y Portugal la leishmaniosis se comporta como una enfermedad hipoendémica.

Los focos de leishmaniosis se incluyen entre los de tipo secundario de Garnham, en los que el perro actúa como principal reservorio de la enfermedad y el hombre como víctima accidental de la afección animal.

Este carácter zoonótico de la enfermedad tiene connotaciones especiales en los individuos que presentan co-infección *Leishmania*/Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida (VIH). Alvar y Jiménez (18) cuestionan el papel del perro como fuente de infección de las leishmanias en estos pacientes en que se aíslan, en más de la mitad de los casos y como causantes de LV, zimodemas (ZM) de *L. infantum* considerados como dermatropos y que no se encuentran en el perro. Los autores señalan que, en estos casos de co-infección, la mayoría en individuos drogo-dependientes, el parásito puede pasar de un individuo a otro mediante las jeringuillas y que el hombre actuaría como reservorio.

Por otro lado, la aparición de este nuevo grupo de riesgo de adquisición de una leishmaniosis⁽¹⁾ ha hecho que varíe considerablemente la epidemiología de esta enfermedad. Así, mientras que el Kala-azar era considerado como una enfermedad fundamentalmente infantil (Tabla 1), en los últimos años el número de casos detectados en adultos ha aumentado considerablemente, debido al comportamiento oportunista del parásito en individuos inmunodeprimidos.

Actualmente, la distribución de la LH coincide totalmente con la distribución de pacientes VIH positivos (173) (Fig. 2).

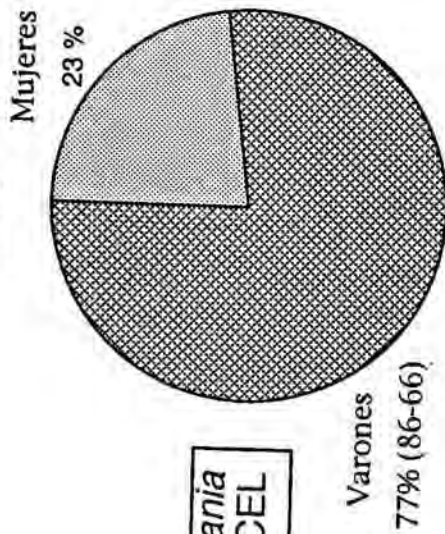
(1) Se calcula que en el sur de Europa entre un 1-5% de todos los pacientes de SIDA desarrollarán una leishmaniosis (15)

Tabla 1.- Distribución por edades de los enfermos de Kala-azar (1925-1983) expresado en porcentajes (tomado de 31)

Edad (años)	Pittaluga 1925	Nájera Angulo 1933	Fernandez y Moragas 1936	Boix Barrios 1943	Comín y col. 1947	Sala Ginabreda 1947	Quiles Mora 1953	Lozano Morales 1955	Mariscal y col. 1980	Cambronero y col. 1983
0-1	14,2	13,8	3,0	35,0	26,0	7,6	9,1	7,0	4,0	14,0
1-5	78,6	73,4	87,0	56,1	64,0	79,4	88,8		40,0	67,4
5-10	5,7	7,6	7,6	4,1	9,0	11,8	2,1	92,0		18,6
10-15	0,9	1,7	1,5	3,2		1,2	-			-
>15	0,6	3,5	-	1,6	1,0	-	-	1,0	56,0	-
total de casos	332 (100%)	427 (100%)	66 (100%)	123 (100%)	- (100%)	170 (100%)	143 (100%)	99 (100%)	104 (100%)	43 (100%)
Procedencia	España	España	Llano de Barcelona	España	Levante	Cataluña	Vega baja del río Segura	Navalmoral de la Mata	Madrid	Madrid

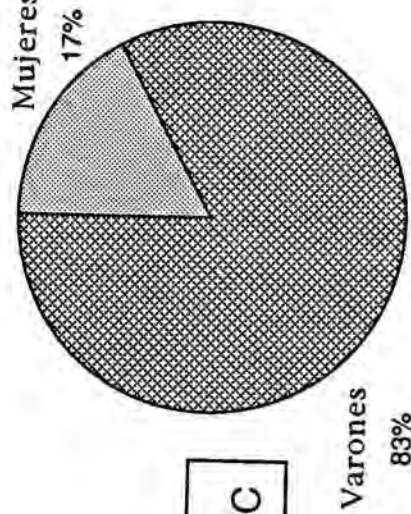
DISTRIBUCION POR:

Sexo



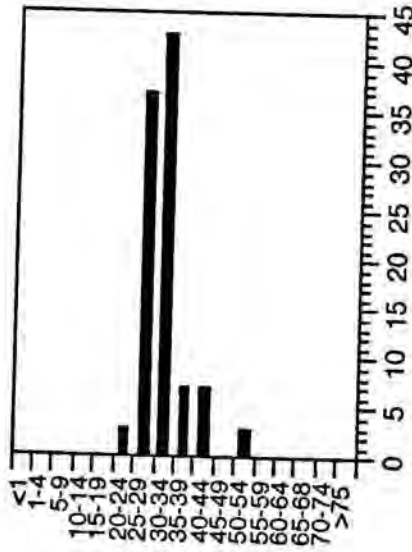
HIV/Leishmania
datos del GCEL

Sexo

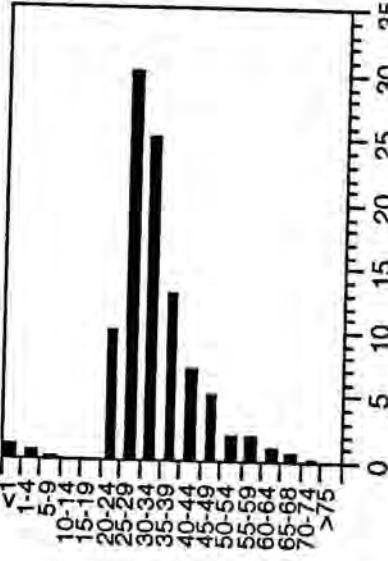


HIV+
datos del BEC

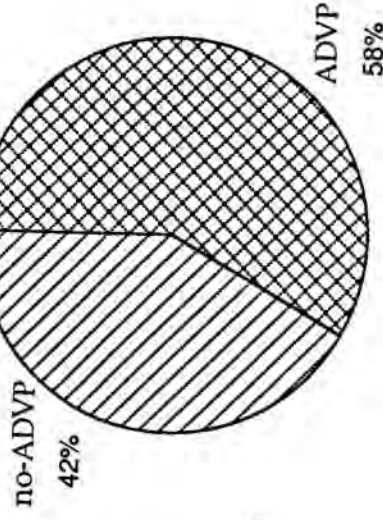
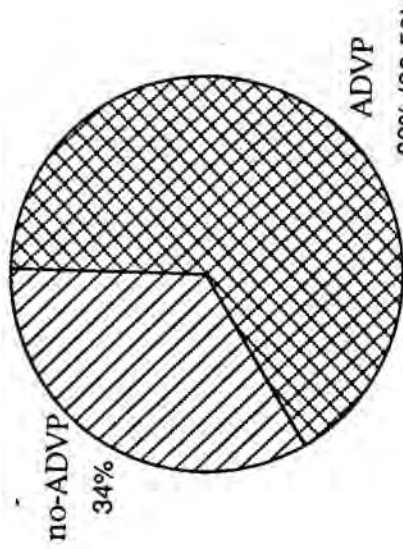
Edad



Nº de casos



ADVP



GCEL: Grup Català per l'Estudi de la Leishmaniosi

BEC: Butlletí Epidemiològic de Catalunya

ADVP: drogodependents

g. 2.- Co-infección *Leishmania*/ VIH en Catalunya (tomado de 173)

I.1.1.1.- EL AGENTE PATÓGENO

Hasta la década de los ochenta, se creía en la existencia de dos especies distintas de *Leishmania* causantes de la distinta patología en el hombre: *L. infantum* (= *L. donovani*, = *L. d. infantum*), responsable del Kala-azar o LV, y *L. tropica*, responsable del botón de Oriente o LC. La primera presentaría al perro como reservorio mientras que para la segunda este papel estaría reservado a roedores.

Las técnicas actuales de identificación del parásito, entre ellas el análisis electroforético de isoenzimas, han permitido demostrar la existencia de una especie, *L. infantum*, como única responsable tanto de las LH como caninas (LCA) (3, 19, 76, 104, 110, 142, 165, 167, 188).

En el hombre se han identificado, hasta la fecha, 22 ZM distintos (18, 66, 77, 78, 94, 95, 120, 164, 168, 204, 212) (Tabla 2).

Tabla 2.- Zimodemas de *L. infantum* aislados del hombre en el foco europeo del mediterráneo occidental

Zimodema	España	Francia	Italia	Portugal
MON-1	X	X	X	X
MON-11		X		
MON-24	X	X	X	X
MON-27			X	
MON-28	X			
MON-29	X	X	X(1)	
MON-33	X	X		
MON-34	X	X		
MON-72			X	
MON-77	X			
MON-78			X	
MON-80	X			
MON-111			X	
MON-136			X	
MON-183	X			
MON-185			X	
MON-188			X	
MON-190			X(1)	
MON-198	X			
MON-199	X			
MON-201			X	
GR-9	X			

(1): se sospecha que la leishmaniosis se ha adquirido en España

MON: Laboratoire d'Écologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Montpellier, Francia

GR: Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Granada

Entre ellos, el ZM MON-1 es el principal responsable de la LV en individuos inmunocompetentes en los que, además, se han citado como responsables de esta patología, presentando un carácter viscerotropo, los ZM MON-27, MON-28, MON-34, MON-72, MON-77 y MON-80. En este mismo grupo de pacientes actúan, con carácter dermatropo responsables de la LC, además del ZM MON-1, los siguientes: MON-11, MON-24, MON-29, MON-33, MON-34, MON-77, MON-78, MON-80 y MON-111.

Este tropismo no se cumple en los sujetos con co-infección *Leishmania*/VIH, ya que, en ellos, es frecuente aislar ZM considerados como dermatropos de LV. En estos pacientes se han aislado una serie de ZM (MON-183, MON-185, MON-188, MON-190, MON-198, MON-199 y MON-201) que no se han encontrado en individuos inmunocompetentes, por lo que se desconoce su tropismo.

L. infantum ha sido también hallada como responsable de LMC en el hombre, en dos casos producidas por el ZM MON-1 (16, 182) y en otro por el ZM MON-77 (M. Gállego, *com. pers.*).

La gran diversidad de ZM aislados en el hombre no se corresponde con los citados del reservorio canino, 9, siendo el ZM MON-1 el principal responsable de la LCa (3, 19, 20, 46, 64, 76, 120, 122, 135, 141, 165, 169) (Tabla 3).

Tabla 3.- Zimodemas de *L. infantum* aislados del reservorio canino en el foco europeo del mediterráneo occidental

Zimodema	España	Francia	Italia	Portugal
MON-1	X	X	X	X
MON-11	X(1)			
MON-18			X?(2)	
MON-27			X	
MON-72			X	
MON-77	X			
MON-82			X	
MON-105	X(3)			
MON-108		X		

(1): Es posible que la cepa canina identificada como MON-11 por el LEM (46) sea el resultado de una contaminación entre cepas.

(2): Se trata de una cepa aislada de un perro perteneciente al ZM MON-18 del complejo *L. donovani*. En otros dos perros y en un zorro fue identificada como perteneciente a este ZM (76), pero más tarde se las situó en el complejo *L. infantum* pertenecientes al ZM MON-82 (141).

(3): MON-105 fue citado por primera vez de una cepa aislada de un *P. perniciosus* infestado experimentalmente sobre un perro al que se le habían aislado los ZM MON-1 y MON-77 (141). Posteriormente, ha sido hallado en perros de Andalucía (GR-16=MON-105) (120).

En los flebotomos vectores (*P. perniciosus*, *P. ariasi* y *P. perfiliewi*) se han aislado 16 ZM del parásito (24, 162, 117, 118, 120, 121, 122, 141, 183, 184) (Tabla 4).

Tabla 4.- Zimodemas de *L. infantum* aislados de los flebotomos vectores en el foco europeo del mediterráneo occidental

Zimodema	España	Francia	Italia	Portugal
MON-1	X(1,2)	X(2)	X(1,3)	X(2)
MON-24				X(2)
MON-28	X(1)			
MON-29	X(1,2)			
MON-33	X(1)			
MON-72			X(1)	
MON-77	X(1)			
MON-105	X(1)			
GR-2	X(1)			
GR-7	X(1)			
GR-8	X(1)			
GR-11	X(1)			
GR-12	X(1)			
GR-13	X(1)			
GR-14	X(1)			
GR-15	X(1)			

(1): *P. perniciosus*

(2): *P. ariasi*

(3): *P. perfiliewi*

La gran diversidad encontrada en el Sur de España (Almería, Granada) no se corresponde con los aislados del hombre y del perro.

A través de los datos obtenidos por los diversos autores de la identificación isoenzimática de las cepas, se desprende que tan sólo 3 ZM (MON-1, MON-72 y MON-77) han sido aislados en el hombre, el perro y los flebotomos vectores.

Por otro lado, de estos datos también se desprende que el perro tan sólo tiene adjudicado el papel de reservorio de 5 de los 18 ZM aislados en el hombre (MON-1, MON-11??, MON-27, MON-72 y MON-77). Esto hace que muchos investigadores se cuestionen la presencia de otros posibles reservorios de *L. infantum* o el posible carácter antroponótico de algunas de las cepas.

I.1.1.2.- EL RESERVORIO

A) RESERVORIO CANINO

El reservorio de una enfermedad es el animal que garantiza la supervivencia del agente etiológico y es la fuente de infección del hombre en un área endémica (9).

El simple hallazgo de leishmanias en un determinado mamífero no es suficiente para atribuirle el papel de reservorio de una LH. Igual que ocurre con el hombre, otros mamíferos también pueden introducirse en el ciclo bio-epidemiológico de los parásitos responsables, sin jugar ningún papel importante en la epidemiología de la afección humana.

Abranches (1) y Killick-Kendrick (99) establecen los requisitos necesarios para considerar un animal como reservorio de la leishmaniosis en un foco determinado:

- Su área de distribución debe coincidir con la de la LH
- Deben aislarse, repetidas veces, las cepas de *Leishmania* que se encuentran en el hombre
- El reservorio debe ser una de las fuentes más importantes de alimentación del vector
- Debe presentar un tipo de parasitismo favorable para la transmisión por la picadura de los flebotomos
- La evolución de la infección en el animal debe ser larga, no fatal en un corto periodo de tiempo

En los focos de leishmaniosis de España, Francia, Italia y Portugal, el perro actúa como principal reservorio de la LH, por lo menos, como ya se ha indicado, para aquellos ZM que han sido aislados en ambos hospedadores.

Las seroprevalencias detectadas, indicadoras de la enzootia canina son elevadas, llegando a alcanzar un 30%, si bien difieren de un foco a otro y también dependiendo de la procedencia de la muestra estudiada (zona rural o urbana, consultas veterinarias, etc.).

En España, entre un 3-5% de todos los perros son seropositivos, alcanzando valores de hasta un 20% en focos endémicos (Ministerio de Sanidad, Programa de Control de la leishmaniosis (en 15).

Rioux y col. (187) indican que una prevalencia del 2,5% es suficiente para mantener la endemidad.

Diversos autores (6, 74, 186) señalan que no todos los perros con serología positiva son infestantes para los flebotomos vectores y actúan como fuente de diseminación. Esta capacidad la presentarían aquellos animales que están en un estado avanzado de la enfermedad, con síntomas aparentes de una leishmaniosis.

Sin embargo, Molina y col. (140) muestran que el porcentaje de flebotomos infestados a partir de animales seropositivos con distinta sintomatología (asintomáticos, oligosintomáticos y sintomáticos) es variable para cada uno de los grupos, no existiendo diferencias significativas.

Aunque es evidente que el perro es el pilar principal de la endemidad de la enfermedad en los focos mediterráneos, la incidencia de la LH no se desarrolla siempre en paralelo con la prevalencia de la infección en el perro (1). Así, en la isla de Ustica, cerca de Sicilia, donde Mansueto y col. (114) encuentran una seroprevalencia de la LCa del 37% no se tiene noticia de casos declarados de LH. Las razones que expliquen este hecho pueden ser complejas y están relacionadas con las apetencias tróficas por parte del vector en la mayoría de los casos (1).

B) OTROS RESERVORIOS

Además del perro, el zorro y la rata han sido incriminados en el ciclo bio-epidemiológico de la leishmaniosis en los focos mencionados, representando un ciclo de tipo primario o enzoótico según la clasificación de Garnham.

El diagnóstico de la **leishmaniosis vulpina (LVu)** se efectuó mediante el empleo de distintas técnicas: cultivo en medio NNN, inoculación experimental a hamster, técnicas serológicas. En ningún caso el parásito pudo ser visualizado al examen directo de improntas de bazo, hígado y médula ósea

Las prevalencias variaron entre 2-10%, siendo en algunos casos similares a las encontradas en la LCa del mismo foco (Tabla 5). Así, Bettini y col. (25) encuentran una prevalencia de la LVu de un 2,6% en un foco de la Toscana (Italia) donde la prevalencia de la LCa es de un 2,9% (75).

Tabla 5.- Prevalencia de la LVu en distintos focos europeos

País	Foco	n/N	P (%)	Método diagnóstico	Referencia
España	Murcia	3/64	4,7	Cultivo	115
	Zaragoza	1/17	5,9	Cultivo	Lucientes en 11
	Cataluña	2/45	4,4	Dot-ELISA	
Francia	Cévennes	2/99	2,02	Cultivo	175
Italia	Toscana	1/39*	2,6	Inoc. exp.	25
	Imperia	5/50	10,0	IFI	113
Portugal	Arrábida	4/71	5,6	Cultivo/IFI	2

n/N: animales parasitados/animales estudiados

P: prevalencia

* Se efectuó la inoculación experimental de homogeneizado de bazo de 39 zorros en un hamster dorado

Aisa (11) y Aisa y col. (13) señalan una prevalencia del 4,4% en zorros procedentes de Cataluña, utilizando como técnica diagnóstica el Dot-ELISA al título serológico de 1/800, título diagnóstico de una LCa. Esta autora indica la existencia de zorros con títulos bajos de anticuerpos (Ac) específicos anti-*Leishmania*, hecho frecuente en la LCa en zonas endémicas (59). Este hecho es también señalado por Mancianti y col. (113) en Italia.

Estos resultados hacen suponer que el zorro, con densidades poblacionales elevadas en algunas zonas, puede introducir la infección en territorios libres de leishmaniosis (113).

A excepción de un aislado perteneciente al ZM MON-89 de *L. infantum* (141), identificado anteriormente como el ZM MON-18 de *L. donovani* (79), todas las cepas procedentes del zorro han pertenecido al ZM MON-1 (2, 17).

Las ratas, tanto la rata negra, *Rattus rattus*, como la rata gris, *R. norvegicus*, han sido encontradas parasitadas por *Leishmania* en España e Italia (Tabla 6).

En ningún caso pudieron observarse parásitos en el examen directo ni se obtuvieron cultivos positivos. El hallazgo tan sólo pudo realizarse mediante inoculación de bazo de las ratas en el hamster dorado.

Tabla 6.- Prevalencia de la leishmaniosis en ratas

País	Foco	Especie	n/N	P (%)	Referencia
España	Granada	<i>R. norvegicus</i>	1/100*	10,0	144
Italia	Toscana	<i>R. rattus</i>	3/143**	2,1	25

* inoculación a hamster de un homogeneizado de bazos de tres ratas

** inoculaciones a hamsters de homogeneizados de bazos de: 3, 5 y 15 ratas respectivamente

Los cuatro aislamientos obtenidos fueron identificados como pertenecientes al ZM MON-1 de *L. infantum* (71, 76, 141).

L1.1.3.- EL VECTOR

Si bien otros artrópodos, como las garrapatas, han sido sospechosos de transmitir la leishmaniosis, este papel está reservado a dípteros nematóceros de la familia Psychodidae subfamilia Phlebotominae (ver 28). Así lo demuestra el hecho de haber sido encontrados, repetidas veces, como hospedadores de *Leishmania* y de haber podido reproducir, en el laboratorio, el ciclo biológico del parásito.

Para que una especie pueda ser considerada como vector de una leishmaniosis Killick-Kendrick (99) establece cuatro requisitos que debe cumplir:

- Los hábitos alimenticios del vector deben incluir el reservorio y el hombre
- En infestaciones naturales del vector se deben aislar, repetidas veces, las mismas leishmanias encontradas en el hombre y en el reservorio
- Su distribución debe coincidir con la distribución de la enfermedad en el hombre y en el reservorio
- El vector debe ser capaz de soportar el desarrollo del parásito y llegar a ser un transmisor eficiente

En los países europeos de la cuenca mediterránea la fauna de flebotomos pertenece a dos géneros, *Phlebotomus* y *Sergentomyia*. Sin embargo, el papel vectorial recae en las especies del género *Phlebotomus*, ya que las especies del género *Sergentomyia* no se alimentan de mamíferos sino de reptiles, siendo responsable de la transmisión, a estos hospedadores, de otras leishmanias que no afectan al hombre.

La transmisión de *L. infantum* está reservada, en nuestro entorno mediterráneo, a tres especies del subgénero *Larrousius*: *P. (L.) ariasi*, *P. (L.) perniciosus* y *P. (L.) perfiliewi* (Tabla 7).

Tabla 7.- Especies vectoras de *L. infantum* en los países europeos de la cuenca mediterránea (aislamiento del parásito)

País	Foco	Especie	Referencia
España	Zaragoza	<i>P. perniciosus</i>	107
		<i>P. ariasi</i>	107
	Priorat	<i>P. perniciosus</i>	183
		<i>P. ariasi</i>	183
	Alpujarras	<i>P. perniciosus</i>	121
	Almería	<i>P. perniciosus</i>	122
Francia	Cévennes	<i>P. ariasi</i>	189
	Niza	<i>P. perniciosus</i>	92
		<i>P. ariasi</i>	92
Italia	Pescara	<i>P. perfiliewi</i>	117
	Nápoles	<i>P. perniciosus</i>	118
Portugal	Arrábida	<i>P. perniciosus</i>	160
		<i>P. ariasi</i>	160
	Alto Douro	<i>P. perniciosus</i>	5
		<i>P. ariasi</i>	5

En algunos focos existe una única especie responsable de la transmisión, tal y como ocurre con *P. ariasi* en la región de las Cévennes en Francia, mientras que en otros focos pueden estar implicadas dos especies, como por ejemplo en el Priorat (*P. ariasi* y *P. perniciosus*).

El vector es el elemento del ciclo biológico de las leishmanias que juega el papel focalizador de la leishmaniosis. Así, Rioux y col. (181) señalan que la incidencia de la enfermedad está ligada a factores dependientes del flebotomo vector no interviniendo la densidad de la población canina.

En el foco de las Cévennes, Rioux y col. (176) indican que una densidad inferior a 5 ejemplares de *P. ariasi* por metro cuadrado hace que la transmisión de la LCa sea excepcional y que la zona de mayor contagiosidad se da en aquellos lugares donde la densidad de esta especie es de 20 ejemplares por metro cuadrado. Densidades superiores no influyen en que haya un mayor porcentaje de perros seropositivos.

Colmenares y col. (41) estudian el tropismo trófico de *P. perniciosus* procedentes de la isla de Menorca y de focos de LCa de Barcelona, Alpujarras y Torroja (Priorat). Los autores señalan que esta especie es oportunista a la hora de escoger un animal para la ingesta de sangre, alimentándose de aquellos a los que tiene más fácil acceso (por su volumen o por su número). Sin embargo, también indican que, en algunos lugares (Barcelona) el número de flebotomos alimentados sobre el perro es superior a lo esperado basado en la proporción de perros/hombre.

Esta preferencia alimenticia por el perro es también señalada por Guy y col. (86) para *P. ariasi* en el sur de Francia.

Ello indicaría que, en las áreas rurales, donde el perro es abundante, se reduce la transmisión al hombre mientras que en las áreas periurbanas, donde la mayoría de vertebrados están representados por el hombre, el riesgo de transmisión a éste es alto (41).

I.2.- ANTECEDENTES DEL FOCO DE LEISHMANIOSIS DEL PRIORAT

Dentro de los estudios que se están llevando a cabo, en la Unidad de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Barcelona, sobre la eco-epidemiología de las leishmaniosis en Cataluña, se incluyen los que están orientados a mejorar el conocimiento del foco de LCa de la comarca del Priorat.

Estudios anteriores realizados en esta zona han mostrado la existencia de un foco con características epidemiológicas muy interesantes:

- Los casos humanos son muy esporádicos, sobre todo la afectación de LV, de la que tan sólo tenemos noticia de dos casos, uno en un adulto que veraneaba en un pueblo de la zona (Poboleda) y otro en un niño que habitaba en la capital de la comarca (Falset). Ello puede explicarse, como ya ha sido indicado, por el hecho de

tratarse de una zona rural, donde la población canina es abundante y la humana queda dispersada.

- La endemia canina se ha mostrado elevada, con una prevalencia global de 10,2%, y una incidencia global de 5,7%. Sin embargo, la distribución de la LCa en las distintas localidades de la comarca es muy heterogénea (55), existiendo localidades donde la prevalencia alcanza valores superiores al 20% mientras que en otras ésta es nula tal y como puede observarse en la Tabla 8. Estos resultados indican la existencia de áreas con microfocos muy activos frente a otras en que la enfermedad está ausente.

Tabla 8.- Prevalencia de la LCa en las distintas localidades del Priorat (tomado de 55)

Localidad	1988		1989		1990		1988-90	
	P	TGM	P	TGM	P	TGM	P _m	TGM _m
1. Bellmunt del Priorat			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. Siurana			0	1,0			0	1
5. Cornudella			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 Guiamets			21,2	40,6			21,2	40,6
8. Falset	8,6	11,7			4,1	11,5	6,4	11,6
9. Gratallops	3,6	4,5	0	15,6			1,8	7,3
10. La Bisbal de Falset			0	10,7			0	10,7
11. La Figuera			5,0	9,8			5,0	9,8
12. La Morera del Montsant	0	1,7			11,1	6,3	4,6	4,0
13. La Torre de Fontaubella			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. El Masroig			2,4	9,2			2,4	9,2
18. Poboleda	25,0	17,9	16,7	10,1			18,6	13,0
19. Porrera	8,9	6,9	9,1	36,6	6,0	18,7	7,6	13,1
20. Pradell de la Teixeta			10,0	18,1			10,0	18,1
21. Scala Dei	18,2	11,3			0	2,9	9,1	7,4
22. Torroja	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. La Vilella Alta			4,3	8,6			4,3	8,6
25. La Vilella Baixa			7,7	50,6	27,3	160,1	16,7	85,8
26. La Venta del Pubill			21,4	80,7	36,4	113,4	28,9	88,9

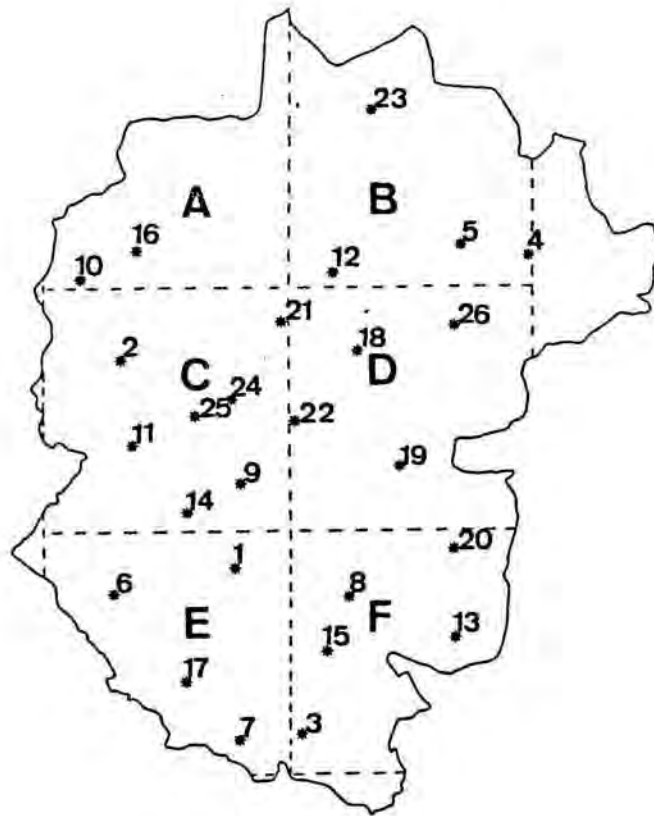
P: prevalencia (%)

m: media

TGM: media geométrica de la inversa de los títulos de anticuerpos

Esta distribución puede sintetizarse, a priori, en la división de la comarca en dos grandes zonas (Fig. 3):

- *Zona de alta endemia*, donde la prevalencia de la LCa se sitúa en 11,9% y las densidades de las especies consideradas vectoras son elevadas. Corresponde a la zona del Baix Priorat y del Priorat històric, situado entre 100-500 m de altitud (Áreas C, D, E y F).
- *Zona de baja endemia*, donde la prevalencia canina es de 5,5% y las densidades de las especies vectoras son muy inferiores. Corresponde a la zona del Alt Priorat, situado a altitudes superiores a 500 m (Áreas A y B).



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. 3.- División del Priorat en áreas (tomado de 55)

Al relacionar la distribución de la LCa, por áreas de 100 Km², con la densidad de las especies vectoras (Tabla 9), se observa un estrecho vínculo muy marcado en el caso de *P. perniciosus* y más difícil de valorar en *P. ariasi*.

Tabla 9.- LCa y sus vectores según las distintas áreas del Priorat (100 Km²) (tomado de 55)

Área	LCa		<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>
	P (%)	TGM	D	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

P: prevalencia D: densidad (Nº flebotomos por metro cuadrado)

TGM: media geométrica de la inversa de los títulos de Ac

Es de remarcar que la altitud es un factor que incide notablemente sobre la densidad de estas especies vectoras, fundamentalmente sobre *P. perniciosus* y que se correlaciona estrechamente con la tasa de prevalencia de la parasitosis (Tabla 10).

Tabla 10.- LCa y sus vectores según los distintos niveles altitudinales (tomado de 55)

Altitud (m)	LCa		<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>
	P (%)	TGM	D	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	17,8	1,0	1,0
701-800	3,2	2,7	0,6	1,9

P: prevalencia D: densidad

TGM: media geométrica de la inversa de los títulos de Ac

- Se sospecha el posible papel del zorro en la cadena epidemiológica. Aisa(11) y Fisa (55), en un estudio sero-epidemiológico efectuado sobre 16 zorros de la comarca encuentran la siguiente distribución de títulos serológicos de Ac específicos anti-*Leishmania* mediante la técnica Dot-ELISA: 5 zorros negativos (31,2%), 4 zorros 1/100 (25%), 5 zorros 1/200 (31,2%) y 2 zorros 1/400 (12,5%). Este alto porcentaje de títulos bajos (1/100-1/400, 68,7%), títulos que se consideran como dudosos en la LCa y que no aparecen prácticamente cuando se analizan animales de zona no endémica, indican un contacto del parásito con el animal sin que se pueda discernir si se trata de la fase prepatente de la enfermedad, de una afección críptica o si son el recuerdo de una leishmaniosis autolimitada, como resultado de una estimulación del sistema inmunológico de la cual derivó la expulsión del parásito.
- Se ha demostrado el papel vectorial, actuando como especies simpátricas, de dos especies de flebotomos, *P. perniciosus* y *P. ariasi* (183).
- El análisis de la ingesta de sangre de *P. perniciosus*, en una de las localidades del Priorat (Torroja), indica que hay un alto porcentaje de éstos que se alimentan sobre el perro. La especie parece ser poco antropofílica en la zona, estando reducida la transmisión de leishmanias al hombre. Sin embargo, los hábitos exo- o endofílicos de los flebotomos y el comportamiento nocturno diferente de los hombres y perros en áreas rurales pueden introducir un error en los resultados (41).
- Se ha podido describir un elevado número de ejemplares ginandromorfos de *Sergentomyia minuta* , 76, en una población aislada del Priorat (63, 65).
- El aislamiento e identificación isoenzimática de distintas cepas de *Leishmania* han permitido observar la existencia de 4 ZM de *L. infantum* circulando en el foco: MON-1, MON-29, MON-77 y MON-105 (55, 64). Dos de ellos, MON-1 y MON-77, aislados del hombre, perro y flebotomos vectores; uno, MON-29, aislado de las dos especies de flebotomos vectoras, y el cuarto, MON-105, aislado a partir del reservorio canino.

I.3.- MOTIVACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

La distribución de la LCa en las distintas localidades del Priorat es muy heterogénea, estando ligada a la densidad de los flebotomos vectores, distinta en los distintos niveles altitudinales.

Sin embargo, en dos localidades del Priorat, Torroja y Margalef, situadas a la misma altitud y con una densidad de uno de los vectores, *P. perniciosus*, aproximadamente igual, la endemia de la LCa es muy distinta (Tabla 11).

Tabla 11.- Prevalencia de la LCa y densidad de los flebotomos vectores en las localidades de Torroja y Margalef (tomado de 55)

Localidad	Altitud (m)	LCa		<i>P. perniciosus</i> D	<i>P. ariasi</i> D
		Pm (%)	TGMm		
Torroja	370	22,1	74,3	48,5	5,1
Margalef	340	0	1,0	48,1	0

P: prevalencia media (1988-1990)

D: densidad

TGM: media geométrica de la inversa de los títulos de Ac

Estos resultados nos indujeron a continuar los estudios eco-epidemiológicos de este foco de LCa para intentar discernir que factores pueden influir en su distribución heterogénea.

Ya se ha mencionado que la densidad poblacional del reservorio canino, similar en las dos poblaciones, no influye en la distribución y en el mantenimiento de un foco de leishmaniosis, sino que está en función de diversos factores dependientes de los flebotomos vectores.

Por otro lado, también se ha visto que la situación altitudinal no es el único factor que influye en la densidad y capacidad vectorial de los flebotomos y, consecuentemente, en la seroprevalencia de la LCa.

Es por ello que nos hemos planteado, como objetivo fundamental del presente trabajo, la obtención de datos relativos a los flebotomos vectores que nos permitan contestar a las siguientes preguntas:

- ¿Como influye el periodo de actividad y la fenología de los flebotomos vectores en la transmisión de la enfermedad?
- ¿Qué periodo/s puede/n ser considerado/s de riesgo de transmisión y por tanto de adquisición de una leishmaniosis?

I.4.- PLAN DE TRABAJO

La imposibilidad, tanto temporal como espacial, de efectuar un estudio de este tipo en todas las localidades del Priorat nos ha obligado a la selección, en un primer tiempo, de dos localidades, Torroja y Margalef, escogidas en función de los resultados heterogéneos de la LCa (prevalencia, incidencia y TGM) y de la similitud en la densidad de los flebotomos vectores obtenidos por Fisa (55).

Para la realización de este estudio, en estas dos localidades se ha establecido el siguiente Plan de trabajo:

1) *Sobre el reservorio canino:*

Realización de encuestas serológicas de la población canina, en ambas localidades, durante los años 1991 y 1992 con objeto de calcular la prevalencia e incidencia de la LCa, y relacionarlas con la actividad de los flebotomos vectores.

Observación clínica de los animales analizados serológicamente, para poder relacionar la clínica con la serología y poder efectuar seguimientos de ambas.

Aislamiento del agente patógeno, mediante obtención de distintas muestras, para poder relacionar la positividad del mismo con el título serológico obtenido y la sintomatología de los animales.

2) *Sobre los flebotomos vectores:*

Captura periódica quincenal de los flebotomos, mediante el empleo de trampas adhesivas, para poder efectuar estudios sobre la riqueza específica, abundancia, densidad y fenología de los mismos y poder conocer mejor los factores que influyen en la distribución de la LCa.

II.- ZONA DE ESTUDIO

II.- ZONA DE ESTUDIO

Para la realización de este capítulo se ha consultado la siguiente bibliografía: 27, 60, 69, 80, 91, 137, 139, 151.

El estudio epidemiológico sobre la LCa se ha llevado a cabo en la comarca del Priorat (Tarragona) (Fig. 4) situada, en la región mediterránea, entre las coordenadas geográficas $41^{\circ} 4' - 41^{\circ} 20'$ latitud norte (N) y $0^{\circ} 43' - 1^{\circ} 0'$ longitud este (E).



Fig. 4.- El Priorat, localización de la comarca en la provincia de Tarragona

Esta comarca ocupa una superficie de $517,31 \text{ Km}^2$ y está situada en una depresión, que sigue el curso del río Siurana, limitada por la Cordillera Prelitoral Catalana que, al llegar al Priorat, se desdobra en dos líneas: una que con el Montsant prolonga su orientación de noreste (NE) a sureste (SE), y otra que va hacia el mar separando al Priorat de la comarca del Baix Camp (Sierra de Llaberia, Sierra de Tivissa). La depresión formada queda abierta, hacia el oeste, a la comarca de la Ribera d' Ebre. Por el N, el Priorat limita con las comarcas de Les Garrigues y de la Conca de Barberà (Fig. 5)

Así, el Priorat está constituido por una depresión central y las montañas periféricas que lo conforman, lo que conlleva un desnivel de más de 1000 m.

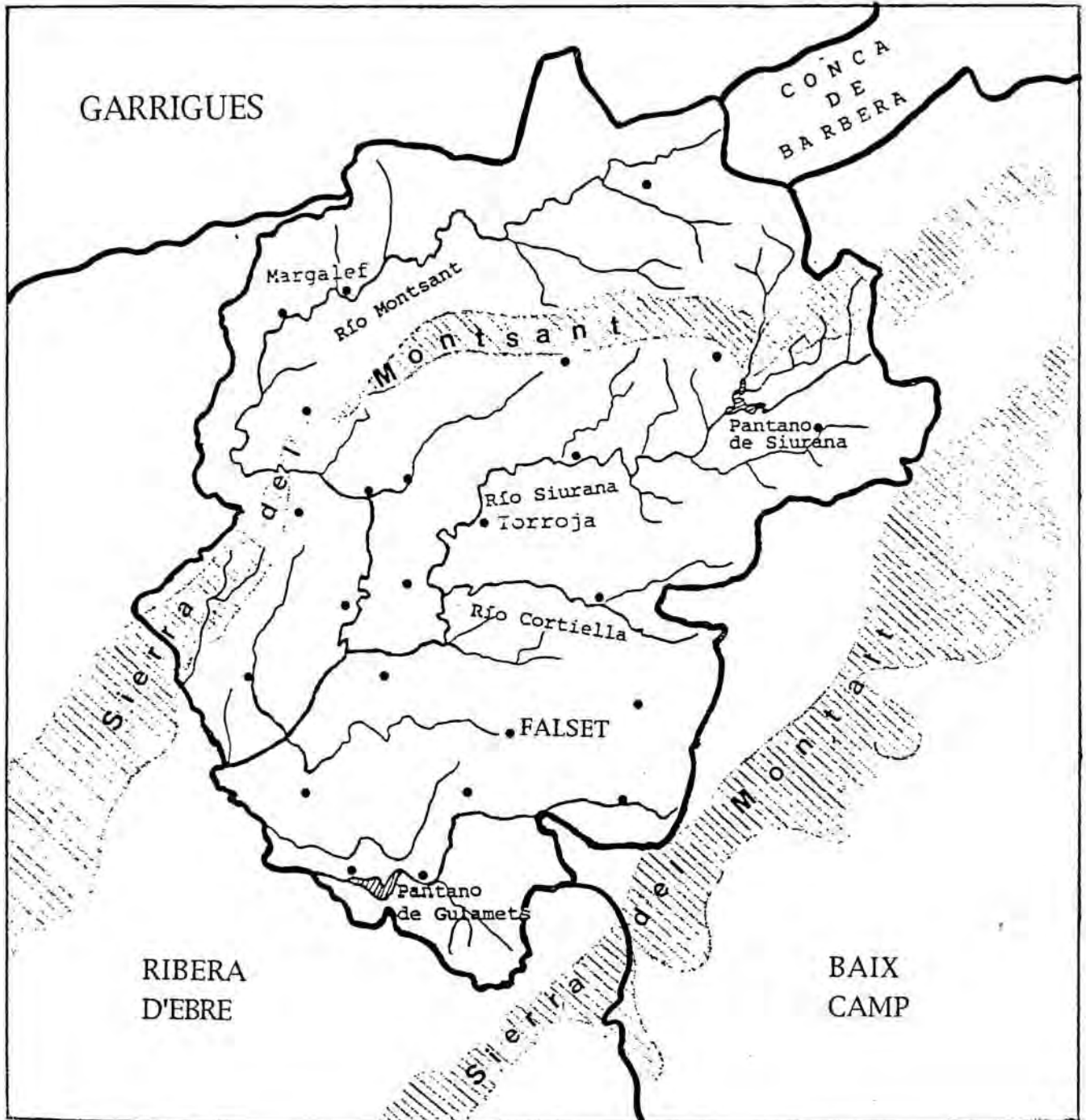


Fig. 5.- El Priorat y sus límites

Concretamente, y para la realización de la presente Memoria, se aportan los datos obtenidos del estudio de dos localidades de la comarca, Torroja y Margalef, situadas en dos de los cuatro sectores que se diferencian en la misma (Fig. 6), y que presentan algunas diferencias con respecto al tipo de suelo, clima y vegetación:

- 1.- Priorat històric, en la vertiente meridional del macizo del Montsant, al que podemos denominar Priorat geològic, que comprende entre otros el municipio de Torroja ($41^{\circ} 15' N$ y $1^{\circ} 00' E$).
- 2.- Baix Priorat, que comprende una zona que envuelve al núcleo central o Priorat geològic por el SE y suroeste (SO).
- 3.- La zona del noroeste, que limita con el Montsant, que comprende entre otros el municipio de Margalef ($41^{\circ} 45' N$ y $1^{\circ} 00' E$).
- 4.- La zona del NE, entre la Sierra de Prades y el Montsant.

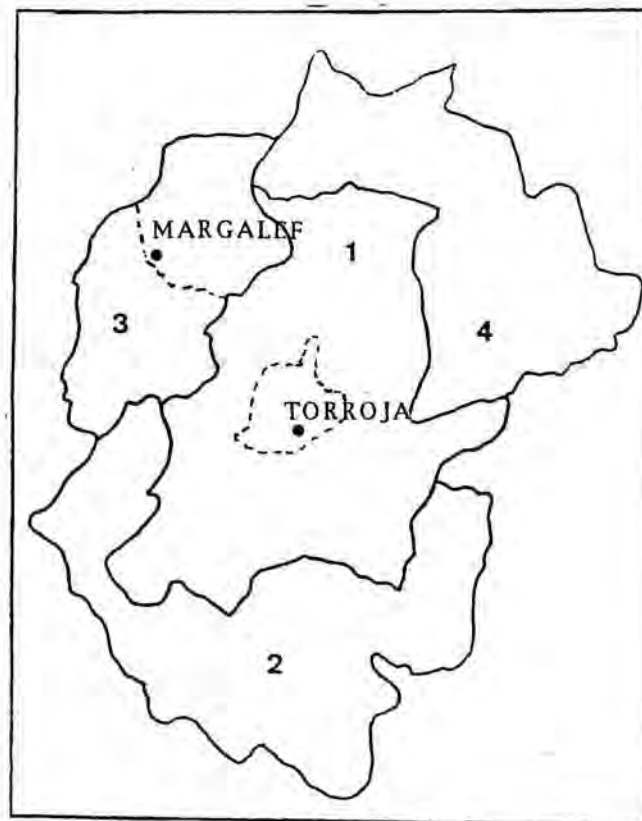


Fig. 6.- El Priorat, sectores de la comarca

El municipio de *Torroja*, situado en el sector 1 y ocupando una superficie de 13,05 Km², está situado a una altitud de 332 m. Se encuentra en una zona de suelos esquistosos sobre pizarras paleozoicas, que sufren una erosión importante debido al recorrido, por los mismos, del río Siurana. Estos suelos son poco profundos, pedregosos y muy poco humíferos, de tipo ácido, formando montañas negruzcas, redondeadas por el envejecimiento.

El municipio de *Margalef*, situado en el sector 3 y ocupando una extensión de 34,60 Km², está situado a una altitud de 379 m. Se encuentra ubicado sobre terrenos triásicos y oligocénicos, con suelos carbonatados. Por la zona pasa el río Montsant.

En cuanto a clima, la comarca posee un bioclima xerótico claramente mediterráneo, templado y seco. Las temperaturas son elevadas, con una media anual de 15°C (8°C en Enero, el mes más frío, y 24°C en Agosto, el mes más caluroso).

La zona del NE recibe, además, influencias propias del clima continental, que penetra por Margalef desde Lérida. Margalef, a pesar de las influencias continentales, y gracias a fenómenos de inversión térmica, presenta unas características especiales de valle cerrado, de clima más húmedo y térmico.

Las precipitaciones anuales oscilan entre 500 y 600 ml, niveles que tan sólo se sobrepasan en los sistemas montañosos, con dos máximos en la primavera y el otoño, y una fuerte sequía en verano.

En la **Tabla 12** quedan reflejadas las temperaturas (máxima, mínima y media) que tuvieron lugar, en las localidades de Torroja y Margalef, durante el periodo de estudio.

La **vegetación** del Priorat es de carácter mediterráneo (sub-mediterráneo). Al conjunto de la comarca se le asignan 3625 hectáreas (ha.) de pinos, 3392 ha. de bosques bajos, 2077 ha. de pastoreo y garrigas, 4409 ha. de espacios improductivos, 62 ha. de árboles de ribera y 312 ha. de bosques y garrigar en la zona del NE.

En *Torroja*, con influencia climática mediterráneo-marítima, predomina, en condiciones naturales, el bosque de encinas y viburno (*Quercetum ilicis galloprovinciale*), que corresponde a la descripción de bosque esclerófilo típico, y el pino blanco (*Pinus halepensis*).

En *Margalef*, con influencia climática mediterráneo-continental, predomina el encinar -en las vertientes solanas- y los robledales (*Violo-Quercetum fagineae*) asociados al pino negro (*Pinus nigra*) y a la encina carrasca o encinar continental (*Quercus rotundifolia*)- en las zonas más umbrías -.

En muchas zonas de la comarca las encinas han sido suplantadas por el bosque de pino blanco que, primitivamente, se limitaba a terrenos abruptos. También han ido apareciendo extensas garrigas, dada la importante deforestación producida.

Tabla 12.- Temperaturas máxima, mínima y media registradas en las localidades de Torroja y Margalef durante el periodo de estudio

Fecha	Torroja			Margalef		
	T máx.	T mín.	T \bar{x}	T máx.	T mín.	T \bar{x}
17.03/01.04.91	16,8	6,5	11,7	16,8	4,0	10,4
02.04/13.04	17,5	6,7	12,1	17,8	3,7	10,8
14.04/27.04	15,9	6,1	11,0	14,6	4,1	9,3
28.04/12.05	17,9	7,3	12,6	16,4	4,3	10,3
13.05/25.05	23,8	11,3	17,5	22,5	8,0	15,2
26.05/11.06	25,9	14,0	19,9	24,3	12,1	18,2
12.06/25.06	26,7	17,3	22,0	27,2	14,5	20,8
26.06/07.07	27,8	19,5	23,6	28,6	15,5	22,0
08.07/19.07	32,2	22,9	27,6	33,8	18,6	26,2
20.07/02.08	31,3	21,5	26,4	31,5	17,1	24,3
03.08/20.08	30,0	23,5	26,8	31,7	17,8	24,7
21.08/31.08	31,4	24,4	27,9	34,6	19,7	27,2
01.09/15.09	27,4	20,0	23,7	29,0	16,5	22,8
16.09/29.09	25,5	17,5	21,5	26,9	14,1	20,5
30.09/11.10	20,7	12,1	16,4	20,6	8,7	14,7
12.10/27.10	16,4	7,2	11,8	16,9	3,6	11,8
28.10/10.11	16,0	8,4	12,2	16,4	4,7	10,6
11.11/23.11	12,5	5,7	9,1	12,1	1,7	6,9
24.11/10.12	12,3	7,2	9,8	11,6	2,3	7,0
11.12/19.12	10,9	5,4	8,2	9,3	2,2	5,8
20.12/05.01.92	8,3	2,0	5,3	8,1	-1,6	3,3
06.01/20.01	7,3	2,1	4,6	6,5	-1,3	2,6

T máx: temperatura máxima

T mín: mínima

T \bar{x} : media

La población de la comarca, que ha experimentado una continua pérdida por el éxodo de sus habitantes hacia otras zonas (Tabla 13), se concentra en la zona comprendida entre los 250 y 500 m (60% de la población).

Tabla 13.- N° de habitantes en las localidades de Torroja y Margalef desde 1900 hasta 1995

Localidad	Año						
	1900	1930	1950	1970	1982	1986	1995
Torroja	255	156	135	114	82	77	130
Margalef	591	535	354	245	167	165	148

La agricultura de secano (viñas, avellanos, almendros, olivos y cereales), constituye la base de la economía de la comarca.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- MATERIAL

El material objeto de nuestro trabajo ha consistido en muestras de sangre de la población canina (reservorio) -con objeto de valorar sus tasas de Ac anti-*Leishmania*- y los flebotomos (vectores) presentes en las dos localidades prospectadas.

III.1.1.- EL RESERVORIO CANINO

Para nuestro trabajo, se ha podido disponer de muestras de sangre de 64 perros, que acudieron a las campañas de vacunación anti-rábica de 1991 y 1992 (meses de Mayo y Marzo, respectivamente). Además, en la localidad de Torroja se ha podido realizar una tercera toma de muestras en Mayo de 1992.

En 38 de los 64 perros se han realizado uno o varios controles serológicos posteriores, lo que representa un total de 111 muestras (Tablas 14 y 15).

Tabla 14.- Nº de perros estudiados y nº de muestras analizadas en las localidades de Torroja y Margalef

Localidad	Nº Perros	Nº Muestras
Torroja	38	70
Margalef	26	41
Total	64	111

Tabla 15.- Distribución temporal de los animales analizados

Localidad	Fecha de obtención de la muestra				
	05.1991	03.1992		05.1992	
		seguimiento	nuevos	seguimiento	nuevos
Torroja	22	12	15	20	1
Margalef	22	15	4		
Total	44	27	19	20	1

En Torroja, se ha realizado el seguimiento serológico de 23 perros, 12 en Marzo de 1992 y 20 en Mayo del mismo año. De los 20 perros a los que se les pudo efectuar un seguimiento en Mayo de 1992, 9 corresponden a animales que ya habían sido controlados en 1991 y en Marzo de 1992, 4 habían sido controlados sólo en 1991 y los 7 restantes corresponden a controles de animales cuya extracción de sangre fue efectuada, por primera vez, en Marzo de 1992 (Tabla 16).

Tabla 16.- Seguimiento de los perros en la localidad de Torroja

05.1991 Nº registro	03.1992 Nº registro	05.1992 Nº registro
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	
5	5	5
6	6	6
7	7	
8		8
9		9
10		10
11		11
12		
13	13	13
14		
15	15	15
16	16	
17	exitus	
18		
19	19	19
20	20	20
21		
22		
	23	
	24	24
	25	25
	26	26
	27	27
	28	28
	29	29
	30	
	31	31
	32	
	33	
	34	
	35	
	36	
	37	
		38

En Margalef, el seguimiento ha podido llevarse a cabo, en Marzo de 1992, sobre 15 de los 22 perros que acudieron a la primera campaña de vacunación anti-rábica (Tabla 17).

Tabla 17.- Seguimiento de los perros en la localidad de Margalef

1991 Nº de registro	1992 Nº de registro
39	39
40	40
41	41
42	42
43	43
44	44
45	45
46	
47	
48	48
49	49
50	
51	
52	52
53	53
54	
55	
56	56
57	57
58	
59	59
60	60
	61
	62
	63
	64

III.1.2.- EL VECTOR: LOS FLEBOTOMOS

El ciclo biológico de los flebotomos, de tipo holometábolo, comprende las fases de huevo, larva, pupa e imago. Todas las formas juveniles ocupan un hábitat diferente al del insecto adulto.

Las hembras ponen los huevos en un substrato arenoso, con abundante materia vegetal u otros deshechos en descomposición, desarrollándose en este medio terrestre las formas juveniles.

Este ciclo terrestre hace muy dificultoso el hallazgo de las formas juveniles en su hábitat natural. Es por ello que los estudios destinados al conocimiento de los flebotomos se basan en los ejemplares adultos.

III.2.- MÉTODOS

III.2.1.- EL RESERVORIO CANINO

III.2.1.1.- SISTEMA DE MUESTREO

Al plantear el estudio epidemiológico de una enfermedad en una zona, es importante realizar una buena elección de la población a encuestar para conseguir unos resultados fiables.

Un método ideal es el de las *encuestas prospectivas*, exhaustivas, que se dirigen a todo el conjunto de la población y tratan de idéntica forma a todos los individuos, enfermos y no enfermos (102). Este tipo de encuestas presenta importantes ventajas:

- Objetividad de los exámenes, ya que no se efectúa una selección de los sujetos "a priori"
- Estandarización de las fuentes de información y de los medios de investigación
- Posibilidad de detectar portadores sanos

Por el contrario, estas encuestas son costosas y largas, tanto en su preparación como en su ejecución, e imposibles de llevar a cabo cuando el efectivo es importante. En estos casos, se utilizan, preferentemente, encuestas con muestras representativas de la población.

Otro tipo de recogida de datos epidemiológicos es el de las *encuestas retrospectivas*, que permite conocer la existencia y repartición aproximativa de una enfermedad. Sin embargo, este método presenta un inconveniente importante, al tratarse de una información selectiva, dado que a la consulta médica o veterinaria llegan sólo los casos con formas aparentes y no se tiene conocimiento de las formas inaparentes (portadores sanos).

Para la realización del presente estudio, se ha intentado seguir una encuesta *prospectiva exhaustiva*. Con este fin, se aprovecharon las campañas obligatorias de vacunación anti-rábica a las que, en principio, deberían acudir todos los perros del municipio.

Teóricamente, el estudio sería sobre todos los perros de los municipios de Torroja y Margalef, pero en la práctica siempre existe un cierto número de ellos que se escapa a la encuesta, bien porque no acuden a la campaña de vacunación, bien porque al no ser un examen obligatorio el dueño no permite la toma de muestra. Sin embargo, autores como Lanotte (102) y Marty y col. (134), al estudiar la repartición de la leishmaniosis, indican que la presencia de estos individuos no localizados no conduce a diferencias estadísticas apreciables.

Estas campañas han sido efectuadas, en primavera, antes del periodo de transmisión de la leishmaniosis, hecho favorable para poder efectuar un estudio del seguimiento y de la evolución de la LCa.

III.2.1.2.- IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL

Para cada municipio, la identificación de los perros en el momento de efectuar la toma de sangre se ha realizado mediante unas fichas, donde se asignaba un número a cada animal, correlativo por orden de llegada y se hacían constar sus principales características: nombre, edad, sexo, raza, pelo, peso, actividad, aspecto; además se incluía el nombre del propietario y su dirección, con el fin de informar del resultado obtenido (Fig. 7).

Se indicaba, detalladamente, los síntomas que podían hacer sospechar de una leishmaniosis y toda la información que aportara el dueño del animal.

Nombre del perro	Edad	Sexo	Raza	Pelo	Peso	Actividad	Aspecto	Propietario

Fig. 7.- Modelo de ficha utilizada para la recogida de los datos

Posteriormente, y una vez en el laboratorio, se pasaban los datos recogidos a una base de datos, en la que los animales estaban numerados siguiendo el número de registro de la misma, y se anotaban los datos ulteriores tanto del resultado serológico, como del seguimiento a lo largo del tiempo (Fig. 8).

Nº registro:

Localidad
 Dueño
 Dirección
 Perro
 Fecha de nacimiento
 Raza
 Sexo
 Pelo
 Actividad

1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

1992 (1) Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

1992 (2) Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel:
 ZM.:

Observaciones

Fig. 8.- Hoja de la base de datos

III.2.1.3.- TOMA DE MUESTRAS Y CONSERVACIÓN

La extracción de la sangre se ha realizado por punción de la vena cefálica de una de las patas delanteras, con una aguja de 1,1 x 40 mm, en casos de perros de complejión grande, y de 0,9 x 25 mm para perros más pequeños, después de una ligera presión en su parte superior (Fig. 9). Se ha recogido en tubos de plástico de 5 ml, correctamente etiquetados, y una alícuota se ha embebido en papeles de filtro (Whatman nº 3), igualmente codificados.

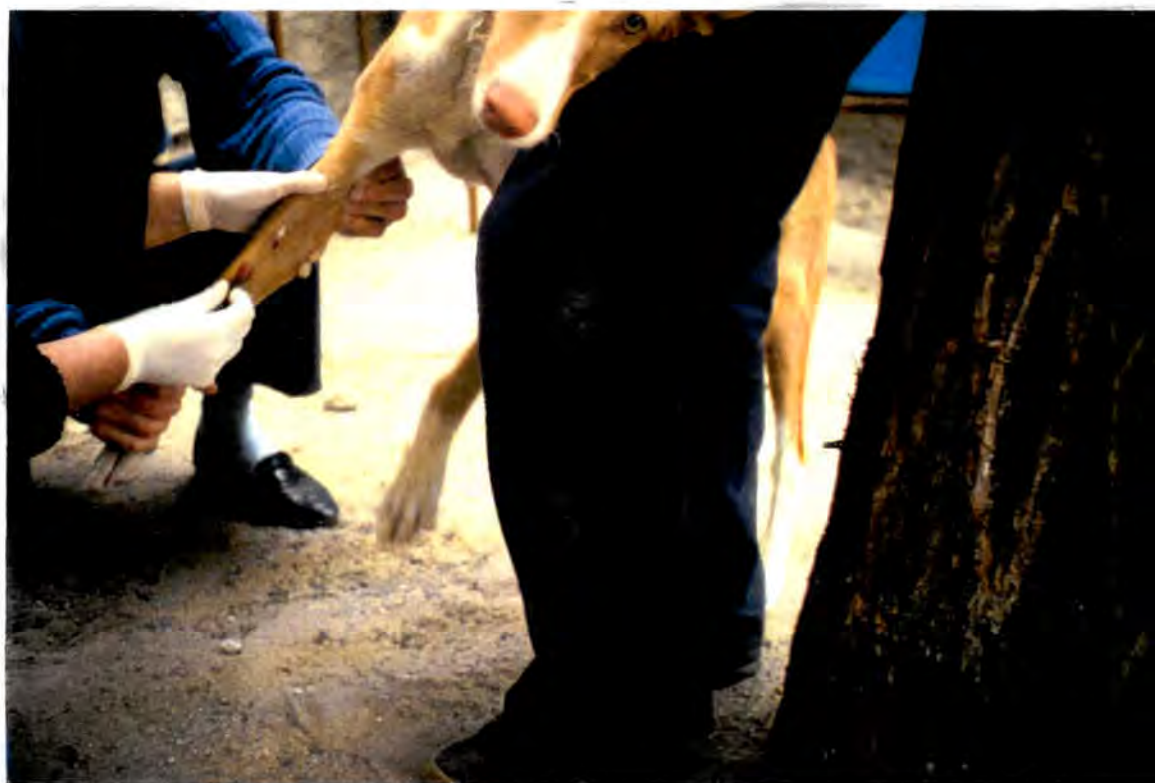


Fig. 9.- Extracción de sangre de la vena cefálica

Si bien se ha utilizado la muestra recogida sobre papel Whatman nº 3 para efectuar el análisis serológico, ya que los resultados obtenidos son totalmente comparables a los obtenidos con muestras de suero (55, 58), se ha procedido a la obtención de muestras de suero para poder aplicar otras técnicas serológicas (ELISA y Western-Blot) (12, 207, 208, 209).

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 a -20 °C, temperatura a la que se considera que puede conservarse durante largo tiempo (84, 89, 93, 96, 149, 203). A temperatura ambiente, la muestra mantiene su título serológico durante aproximadamente 40 días, observándose modificaciones, transcurrido este periodo de tiempo, en función de la temperatura (203).
- *Sueros*: la sangre recogida en tubo se deja coagular a temperatura ambiente (149) y se centrifuga 5 minutos a 2500 revoluciones por minuto (r.p.m.). Se separa el suero y se almacena congelado a -20°C, en diversas alícuotas y sin adicionar conservantes.

III.2.1.4.- DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO: DOT-ELISA

Se ha utilizado la técnica "Dot-ELISA" descrita y estandarizada por Pappas (152, 153, 154, 155, 157, 158) para el diagnóstico de la LV humana en el VM y adaptada por Fisa y col. (58) para el diagnóstico de la LCa.

Es una técnica inmunoenzimática, de lectura visual, que precisa tan solo de pequeños volúmenes de antígeno (Ag) fijados sobre membrana de nitrocelulosa (NC) y un substrato cromogénico precipitable. Es por ello una técnica fácilmente adaptable a estudios sobre el terreno, que presenta como ventajas importantes:

- su rapidez (aproximadamente 2h)
- la posibilidad de efectuarla en trabajos de campo, dado que la conservación de los reactivos puede ser a temperatura ambiente y que la lectura es visual (56)
- una sensibilidad y especificidad equivalentes a las técnicas ELISA estándar (153)

Por ello ha sido aplicada por diversos autores al estudio de las leishmaniosis (55, 56, 59, 85, 200, 201, 205).

A) Descripción de la técnica:

-Antígeno utilizado:

Como Ag se ha utilizado promastigotes enteros formolados de una cepa de *Leishmania infantum* (MHOM/FR/78/LEM-75/MON-1), aislada y cedida por el Laboratoire d'Écologie Médicale et Pathologie Parasitaire (LEM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Montpellier (Francia). Esta cepa fue aislada mediante punción esternal de un sujeto con una LV procedente de Béziers (Francia). La cepa se sembró en el medio de Novy, McNeal y Nicolle (NNN), y se ha mantenido congelada en nitrógeno líquido (Anexo 2).

- Obtención del antígeno :

Para preparar el Ag es imprescindible conseguir un número importante de promastigotes. Para ello, se realizan cultivos en masa, en medio corazón-cerebro-sangre (CCS)⁽¹⁾ (Anexo 3). El procedimiento a seguir, para obtener el Ag a partir del cultivo en masa, es el siguiente:

- a) A los 5-7 días de realizar el cultivo, se recoge la fase líquida y se centrifuga a pocas revoluciones, 500 r.p.m., durante 10 minutos, para eliminar los residuos de gelosa que puedan existir.
- b) Se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 2500 r.p.m. durante 10 minutos para lograr la sedimentación de los promastigotes.
- c) Se realizan 3 lavados del sedimento: el primero con solución salina al 0,3%, para lisis de los hematíes presentes, y los siguientes con solución salina al 0,9%, centrifugando a 2500 r.p.m. durante 10 minutos. Antes de proceder a realizar el último centrifugado, se recoge una alícuota que se diluye a 1/100 en tampón fosfato (PBS)-formol 1,5% (Anexo 4) para realizar el recuento, en cámara de Fuchs-Rosenthal, bajo el microscopio a 400 aumentos.
- d) Los promastigotes se resuspenden en tampón PBS pH 7,2 formol 1,5 %, hasta obtener una concentración final de $2 \cdot 10^5$ promastigotes/ μ l
- e) El Ag así obtenido se conserva en frigorífico a 4°C y se numera el lote.

(1) Pueden utilizarse otros medios líquidos, tanto para el aislamiento de las leishmanias como para el cultivo en masa, como son el Schneider, MEM, RPMI, medio 199, todos ellos suplementados con suero bovino fetal (SBF).

- Soporte:

Se han utilizado membranas de NC (Millipore 4 Filter/Poro de $0,45 \mu\text{m}$), que permiten la unión de sustancias muy distintas como proteínas, ácidos nucleicos, organelas subcelulares, hongos, protozoos, bacterias y virus (88). Las membranas se cortan, evitando el contacto con los dedos, en rectángulos de $9 \times 12 \text{ cm}$, que se introducen en un aparato Bio-Dot (Bio-Rad Aparattus) (Fig. 10 a y b).

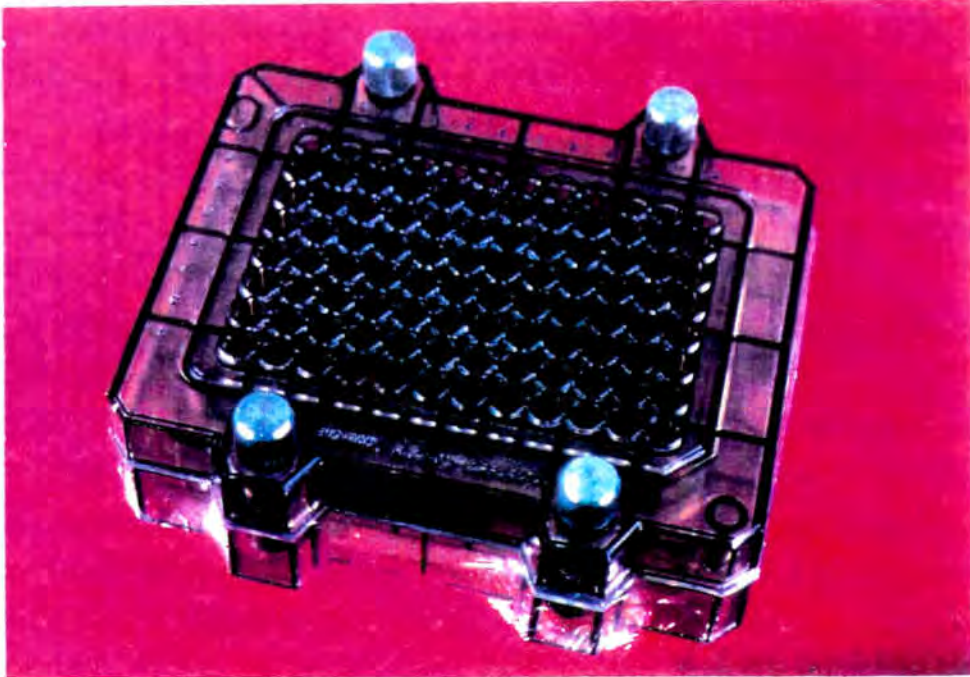


Fig. 10 a.- Aparato Bio-Dot utilizado

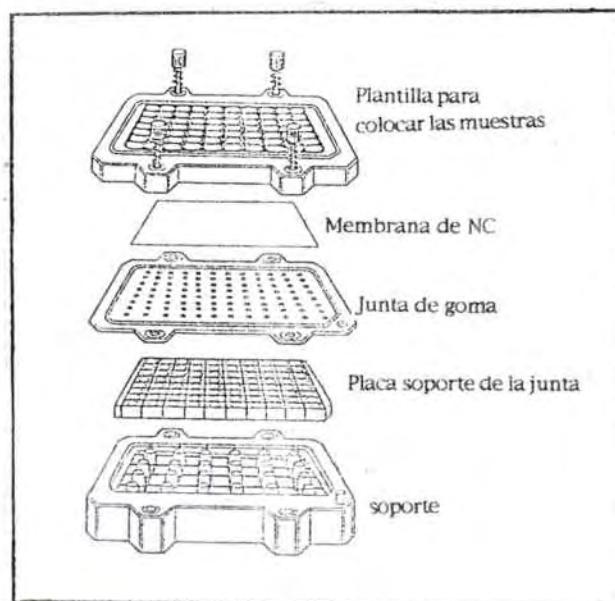


Fig. 10 b.- Esquema y montaje del aparato Bio-Dot

-Sensibilización de las membranas de NC:

Consta de los siguientes pasos:

- a) Se humedece la membrana de NC en el tampón de trabajo, Tris-salino (TS) 20 mM (Anexo 4).
- b) Se coloca la membrana de NC entre pliegues de papel de filtro y se deja secar en estufa a 37°C, durante toda la noche.
- c) Se coloca la membrana de NC en el aparato Bio-Dot.
- d) Se sensibiliza la membrana de NC con el Ag. Para ello se coloca 1 µl de Ag, en cada pocillo, con una jeringa Hamilton de 50 µl con dispositivo de repetición. La unión de las proteínas a la membrana de NC se basa en uniones no-covalentes poco conocidas, (170, 211). Se ha de tener en cuenta que la capacidad de adsorción de la membrana va disminuyendo a lo largo del tiempo.
- e) Se saca la membrana del aparato Bio-Dot, y se deja secar, entre papeles de filtro, en estufa a 37°C, durante 1 h, para favorecer la adsorción del Ag.
- f) Se procede al bloqueo para evitar la unión inespecífica de proteínas a la membrana de NC, lo que conduciría a falsas reacciones positivas o a una coloración de fondo importante. Como solución bloqueante hemos empleado TS-leche descremada (Régilait) al 5% (TS-leche 5%, Anexo 4). Las proteínas de la leche bloquean las zonas de NC a las que no se ha adherido el Ag. El bloqueo se efectúa durante 30 min, con agitación a 75 r.p.m. en la estufa a 37°C.
- g) Se procede al lavado con TS para eliminar los restos de leche.

Las membranas pueden ser conservadas en este punto. Para ello se envuelven en papel de aluminio, y se congelan a -20°C. Cada membrana lleva un número de registro y se anotan, en la libreta que se dispone para ello, los siguientes datos: número de membrana, fecha de elaboración, persona que la ha confeccionado, fecha de utilización, lote de Ag utilizado y otras observaciones (Fig. 11).

Nº	Fecha de preparación	Lote de Ag	Operador	Fecha de utilización	Tiempo de descongelación	Observaciones

Fig. 11.- Modelo de registro de las placas de NC

- Conjugado:

Se emplea proteína A (Prot-A) marcada con peroxidasa (PO) (Sigma) a la dilución adecuada, que en nuestro caso ha sido 1/2000, en tampón Tris-salino-tween-leche descremada al 1% (TST-leche 1%, Anexo 4).

- Substrato:

Se utiliza el substrato cromogénico precipitable 4-cloro-1-naftol (4C1N) (Merck) (Anexo 4).

- Controles:

Para cada placa se han utilizado:

- Control positivo (C+): suero de perro cuyo título sea elevado (Dot-ELISA 1/6400).
- Control positivo bajo (C+b): suero de perro cuyo título Dot-ELISA sea 1/1600.
- Control negativo (C-): suero negativo, previamente valorado, correspondiente a un perro joven, con posibilidad nula de contacto con el parásito.
- Control de conjugado (CC): sin adición de suero, para observar que no existe reacción inespecífica entre Ag y substrato.
- Control de suero (B): sin adición de conjugado, para descartar que el suero o la sangre total posean actividad peroxidásica por sí mismos.

- Lectura:

Se observa la aparición de pequeñas manchas de color azul intenso, bien definidas. La lectura se realiza observando la máxima dilución donde aún aparece color.

- Marcha de la reacción:

- a) Se parte de la membrana de NC previamente sensibilizada. Si se utiliza una membrana previamente congelada se deja descongelar, durante 10-15 min., a temperatura ambiente.
- b) Se humedece la membrana de NC en el tampón de trabajo, TS.
- c) Se coloca la membrana en el aparato Bio-Dot, sin dejarla secar.
- d) Se colocan 50 μ l de tampón TST-leche 1% a cada pocillo a partir de la dilución 1/100.

- e) Se ensayan diluciones dobles crecientes (1/100 -1/6400), de los sueros problemas (P) y de los controles. Para ello se colocan 50 μ l de los sueros problemas y controles, partiendo de una dilución 1/100 (Anexo 5), en las columnas correspondientes al control de suero (B), a la dilución 1/100 y a la 1/200, haciéndolo llegar hasta la dilución de 1/6400 con el TST-leche 1% (Fig. 12).
- f) Se incuba en estufa a 37°C con agitación constante a 75 r.p.m., durante 30 minutos.
- g) Se decantan las soluciones y se lava 3 veces con TST, a razón de 200 μ l por pocillo, durante 5 minutos cada vez, con agitación a 200 r.p.m, en estufa a 37°C.
- h) Se adicionan 50 μ l del conjugado (Prot A-PO dilución 1/2000) a los pocillos, a excepción del blanco en el que se coloca 50 μ l de TST-leche 1%. Se deja incubar durante 30 minutos, en estufa a 37°C y con agitación lenta, 75 r.p.m.
- i) Se retira la membrana de NC del aparato Bio-Dot y se procede a su lavado, 2 veces con TST, 1 vez con TS y un último lavado con TS 500 mM (Anexo 4), durante 5 minutos cada lavado, y con agitación a 200 r.p.m.
- j) Se procede al revelado con el substrato cromogénico, dejando incubar a 37°C con agitación constante a 175 r.p.m., durante unos minutos (5-10 minutos), hasta que el control positivo alcance el valor conocido (observando manchas de color azul intenso) y sin que aparezca color en el control negativo.
- k) Se detiene la reacción enzimática con agua corriente.
- l) Se procede a la lectura visual, después de secar bien la placa, observando la máxima dilución donde aún aparece color (Fig. 13)⁽¹⁾.

(1) Consideramos como título diagnóstico de la LCa mediante la técnica de Dot-ELISA el de 1/800. Este título fue establecido por Fisa y col. (58) al comparar esta técnica con la de IFI, utilizada de referencia

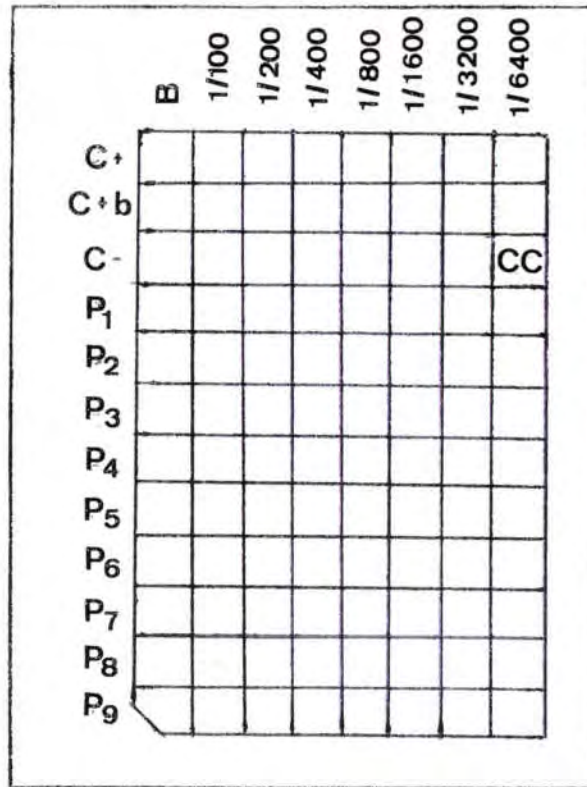


Fig. 12.- Esquema de disposición de los controles y sueros en el Dot-ELISA, indicando que dilución corresponde a cada columna

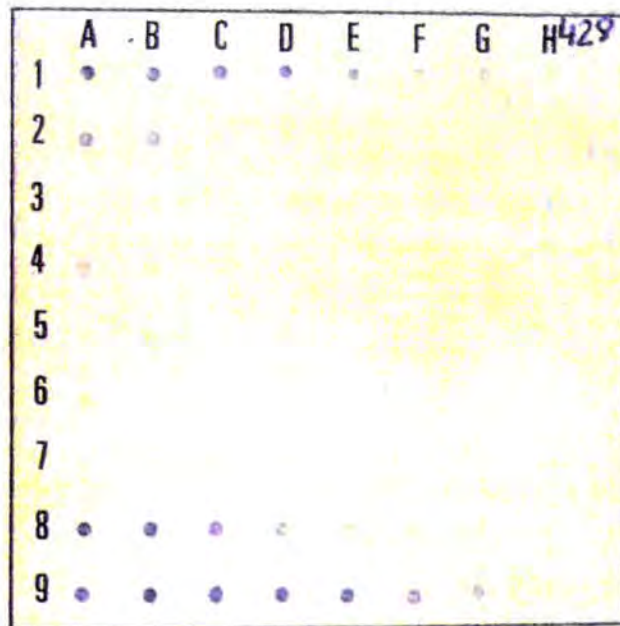


Fig. 13.- Placa revelada de Dot-ELISA

III.2.1.5.- AISLAMIENTO DE CEPAS DE *LEISHMANIA INFANTUM*

El aislamiento de cepas de *L. infantum* se efectuó a los perros de Torroja que acudieron en Mayo de 1992.

A) AISLAMIENTO DE LA MUESTRA

Punción ganglionar

Recomendada por su sencillez, buenos resultados y bajo riesgo (102, 180), ha sido una de las técnicas utilizadas 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 25000 Unidades Internacionales (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. Se siembra en medio de cultivo (Fig. 14).

Punción de médula ósea

La punción esternal de médula ósea (81) 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 cartilago-costal (epífisis costal) de la

costilla (entre la 5ª y la 6ª) y con una jeringa de 5 ml (ICO estéril), con 1 ml de solución salina y 25000 UI de penicilina, y aguja de 0,9x25 mm, se penetra directamente en la médula ósea y se realiza el aspirado. Se siembra en medio de cultivo.

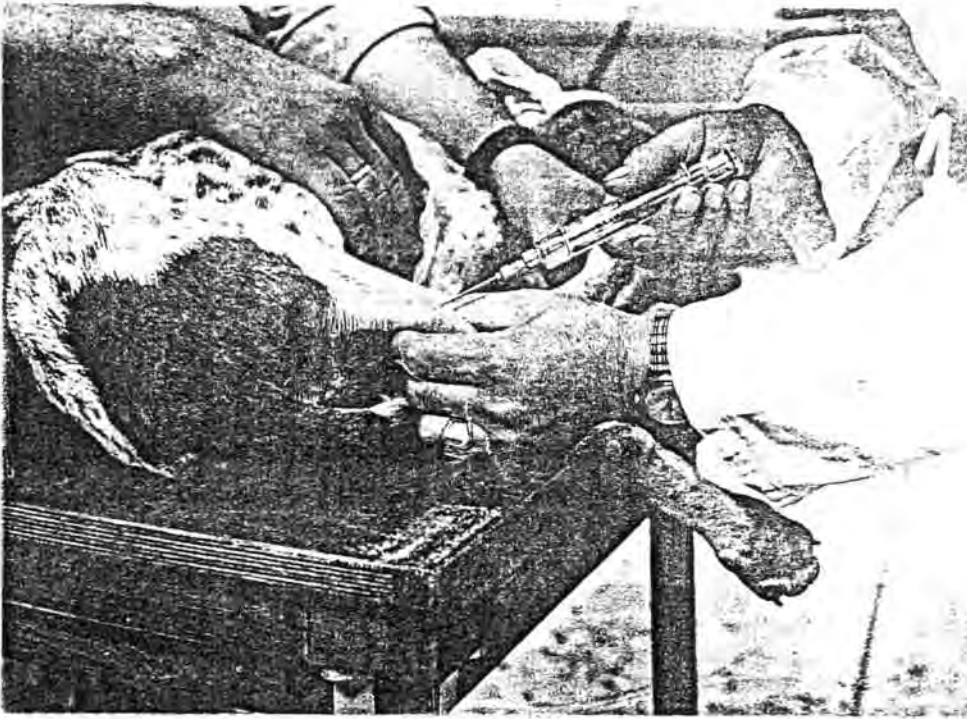


Fig. 14.- Punción ganglionar

Biopsia cutánea

Técnica agresiva y de resultados mediocres, la biopsia cutánea es, sin embargo, importante para la identificación de cepas de *Leishmania* con carácter dermatropo.

Las biopsias cutáneas se han realizado a partir de la piel aparentemente sana de todos los perros y, en 2 casos (Nº registro: 11 y 28), se hizo también biopsia de zona ulcerada o con alopecia y descamación.

-Técnica

Se limpia cuidadosamente, con alcohol de 70°, la zona a biopsiar. En los casos en que se practiquen biopsias a partir de lesiones ulceradas se levanta la costra, si ésta se ha formado, y se efectúa la biopsia de los márgenes de la úlcera, ya que con este procedimiento se obtienen los mejores resultados (150). Utilizando siempre material estéril, se realiza la biopsia con ayuda de un bisturí y de unas pinzas. Se extrae la pequeña porción biopsiada y se coloca en un tubo con solución salina estéril y penicilina (25000 UI/ml) que se guarda en nevera durante 24 h. A continuación se coloca en un homogeneizador, con un poco de solución salina estéril y penicilina (1 ml de solución salina con 25000 UI de penicilina), se homogeneiza y se siembra en varios tubos de medio de cultivo.

B) 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.

Como medio de cultivo se ha utilizado el medio NNN, que es el medio habitualmente utilizado en nuestro laboratorio para el aislamiento de cepas de *Leishmania*. Sin embargo, en ocasiones se han utilizado medios más enriquecidos (CCS).

La muestra se siembra en el medio difásico, en 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 sembrar es muy sanguinolenta (52).

Los tubos sembrados se colocan en estufa a 24°C. A los 7 días se realiza el primer examen microscópico, entre portaobjetos y cubreobjetos, de una gota de la fase líquida, previamente homogeneizada, donde crece la forma promastigota del protozoo. Cuando el examen es negativo, se procede a la resiembra, no considerándose definitivamente como negativo el cultivo hasta haber procedido a realizar 4 resiembras consecutivas.

III.2.2.- EL FLEBOTOMO VECTOR

Las técnicas y tipos de trampas descritas para la recolección de adultos de flebotómidos son abundantes: trampas Disney, trampas de CO₂, capturadores manuales, mosquiteras con cebo, trampas de luz (TL) (tipo CDC -Center of Disease Control, Atlanta, USA-, etc.) (98, 178). Cada una de estas trampas tiene una mayor o menor utilidad dependiendo del tipo de estudio que quiera llevarse a cabo (corológico, fenológico, fototropismos, apetencias tróficas, parasitismo, edad fisiológica, etc.).

En nuestro caso, y dado que queríamos efectuar un estudio comparativo sobre la distribución y fenología de los flebotomos en las dos poblaciones estudiadas del Priorat, hemos utilizado el método de los papeles adhesivos (PA) (Fig. 15).

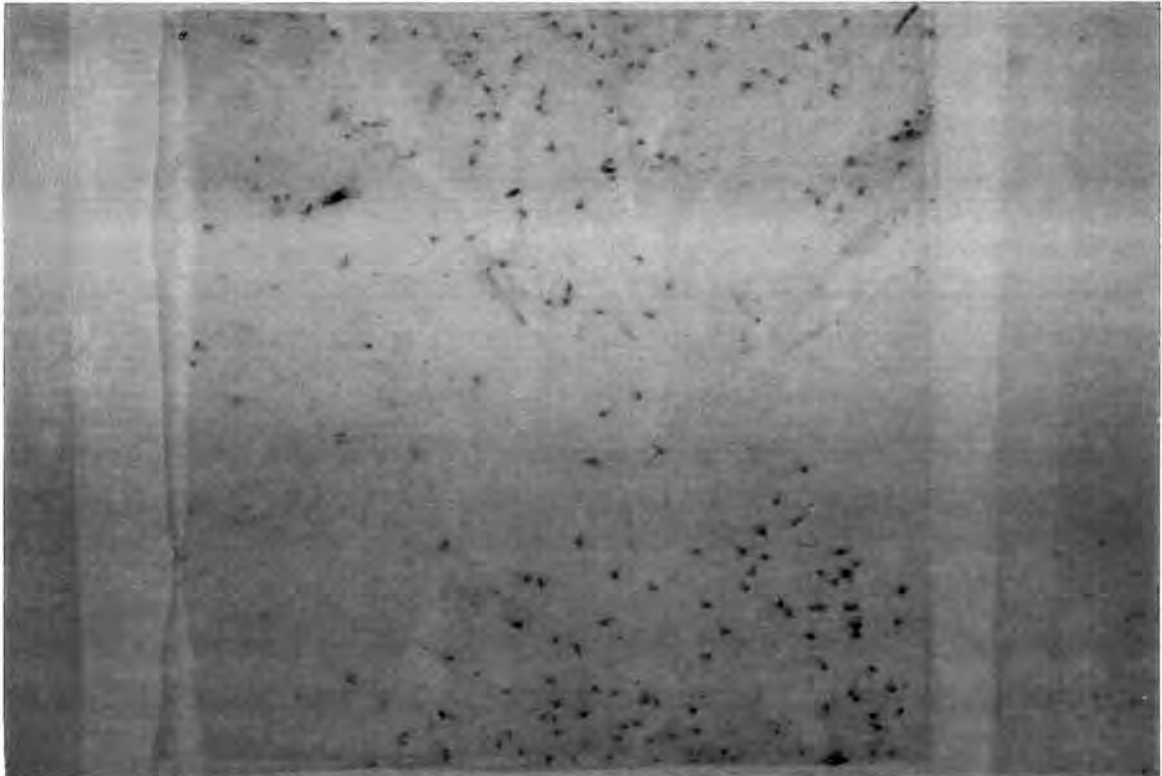


Fig. 15.- Papel adhesivo, con flebotomos capturados

III.2.2.1.- CAPTURA CON PAPEL ADHESIVO

Se han utilizado trampas adhesivas de papel blanco mate, de 20 cm de lado, embebidas en aceite de ricino purificado (aceite oficinal, Compañía Auxiliar para el Consorcio y la Industria) hasta obtener una apariencia translúcida. Este aceite posee propiedades especiales que lo convierten en un medio ideal:

- excelente viscosidad, que favorece la adhesión de los flebotomos
- buena conservación y solubilidad en alcohol de 95°, lo que permite recuperar fácilmente los especímenes para su posterior identificación
- reducción del poder atractivo sobre los depredadores (hormigas, gasterópodos, roedores, etc.)

Los papeles se colocan en lugares oscuros y protegidos del viento, como pueden ser grutas, fisuras de las rocas, mechinales, etc., considerados sitios de reposo de los flebotomos.

Los papeles deben ser introducidos profundamente en los lugares de captura, manteniéndose extendidos con ayuda de una caña, palo de plástico, etc., siempre que sea posible, para conseguir una mayor superficie de contacto.

III.2.2.2. - ENCLAVES Y ÉPOCA DE CAPTURA

Se han estudiado 3 estaciones, 2 situadas en Torroja y 1 en Margalef:

- 1.- Torroja: mechinales de un muro de piedra de un descampado situado en los límites del pueblo, y cercano a la carretera. Altitud: 340 m, orientación: E (Fig. 16).
- 2.- Torroja: agujeros de un muro de cemento de una casa situada al borde de la carretera y a 150 m de la estación anterior. Altitud: 336 m, orientación: E (Fig. 17).
- 3.- Margalef, entrada al pueblo: cueva grande, al lado de la carretera y próxima a una granja abandonada de cerdos. Altitud: 370 m, orientación: SE (Fig. 18).



Fig. 16.- Estación 1 (Torroja)



Fig. 17.- Estación 2 (Torroja)



Fig. 18.- Estación 3 (Margalef)

El estudio de la densidad de los flebotomos y de su fenología se ha llevado a cabo en 1991. Para ello, las trampas fueron renovadas, quincenalmente, desde el 17 de Marzo de 1991 hasta el 20 de Enero de 1992, fecha en que al menos por dos veces consecutivas anteriores no se capturó ningún ejemplar en alguna de las dos localidades (Tabla 18).

La continuidad y duración del trampeo por un lado, y los caracteres ecológicos particulares de las estaciones de muestreo -cavidades situadas al abrigo-, por otro lado, permiten, tal como señalan Rioux y Golvan (178), suprimir las fluctuaciones debidas a las perturbaciones meteorológicas pasajeras.

Por otro lado, el hecho de utilizar la técnica de los PA elimina los errores que comportan otras técnicas de estudio, destinadas a conocer el ritmo de eclosión imaginal a lo largo del periodo de actividad, tales como el método con capturador manual, la captura nocturna contra los muros o diurna en las cavidades, cuyos resultados están en función del coeficiente personal del capturador, duración del trampeo, influencias meteorológicas, etc.

Debe señalarse, sin embargo, que este tipo de muestreo manifiesta una cierta selectividad, tanto sobre el sexo (178, 180) como sobre las especies capturadas (29, 61).

Tabla 18.- Periodos de captura

Fecha	Torroja	Margalef
17.03/01.04.91	-	-
02.04/13.04	-	-
14.04/27.04	-	-
28.04/12.05	-	+
13.05/25.05	-	-
26.05/11.06	+	+
12.06/25.06	+	+
26.06/07.07	+	+
08.07/19.07	+	+
20.07/02.08	+	+
03.08/20.08	+	+
21.08/31.08	+	+
01.09/15.09	+	+
16.09/29.09	+	+
30.09/11.10	+	+
12.10/27.10	+	+
28.10/10.11	+	+
11.11/23.11	+	+
24.11/10.12	+	+
11.12/19.12	-	+
20.12/05.01.92	-	-
06.01/20.01	-	-

-: capturas negativas

+: capturas positivas

III.2.2.3.- SUPERFICIE ESTUDIADA

La superficie total, en Torroja y Margalef, ha sido de 31,2 y 41,96 m² respectivamente. Sin embargo, y para ser aplicada posteriormente al estudio de la densidad poblacional de los flebotomos, no se ha tenido en cuenta la superficie de

los periodos comprendidos entre el 17.03/27.04.91 y 20.12.91/20.01.92, en que las capturas han sido negativas en ambas localidades. Así, en Torroja y en Margalef, la superficie que se ha tenido en cuenta para reflejar los resultados es de 24,28 y 32,52 m² respectivamente (Tabla 19).

Tabla 19.- Superficie estudiada (m²) para la captura de flebotomos

Fecha	Torroja		Margalef	
	Nº papeles	Superficie	Nº papeles	Superficie
17.03/01.04.91	37	1,48	46	1,84
02.04/13.04	37	1,48	42	1,68
14.04/27.04	29	1,16	32	1,28
28.04/12.05	35	1,4	48	1,92
13.05/25.05	34	1,36	45	1,8
26.05/11.06	38	1,52	47	1,88
12.06/25.06	45	1,8	42	1,68
26.06/07.07	36	1,44	39	1,56
08.07/19.07	24	0,96	35	1,4
20.07/02.08	35	1,4	50	2,0
03.08/20.08	35	1,4	34	1,36
21.08/31.08	35	1,4	27	1,08
01.09/15.09	35	1,4	30	1,2
16.09/29.09	39	1,56	56	2,24
30.09/11.10	35	1,4	57	2,28
12.10/27.10	35	1,4	64	2,56
27.10/10.11	40	1,6	63	2,52
11.11/23.11	34	1,36	63	2,52
24.11/10.12	37	1,48	56	2,24
11.12/19.12	35	1,4	57	2,28
20.12/05.01.92	35	1,4	60	2,4
06.01/20.01	35	1,4	56	2,24
17.3.91/20.1.92	780	31,2	1049	41,96
28.04/19.12.91	607	24,28	813	32,52

III.2.2.3.- RECOLECCIÓN Y TOMA DE DATOS

La recolección de las trampas se ha realizado agrupando los PA de cada estación en paquetes de papel sulfurado, que asegura su conservación, para ser transportados al Laboratorio.

Los paquetes, se han identificado con el número de la estación, fecha de recolección y número de papeles recogidos. Para evitar su deterioro, y cuando no fue posible la recogida inmediata de los flebotomos, se han guardado en nevera y/o congelador.

III.2.2.4.- FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN

Los flebotomos, visualizados por transparencia bajo una luz intensa, se han recuperado con ayuda de un pincel embebido en alcohol de 95°, capaz de disolver el aceite de ricino, y se han introducido en viales que contenían este alcohol.

Los flebotomos se han dejado en estos viales unas 48 horas, tiempo necesario para disolver totalmente el aceite; transcurrido este tiempo se ha sustituido el alcohol de 95° por alcohol de 70°, donde se han conservado hasta proceder a su montaje.

En el interior de cada vial se colocó un papel vegetal en el que se indicaba el número de estación, periodo de captura y número de papeles recuperados.

III.2.2.5.- MONTAJE

El montaje de los flebotomos se ha efectuado en el líquido de Hoyer (Anexo 4), debido a la rapidez y facilidad del montaje y la buena clarificación que proporciona.

El montaje de los flebotomos se realiza con cuidado extremo, con el fin de no estropear los ejemplares, y procurando colocar en posición adecuada aquellas partes que permiten más tarde realizar su identificación específica. Así, la cabeza se coloca en posición dorso-ventral, y el abdomen ha de quedar en posición lateral (Fig. 19).

Las preparaciones se depositan en una placa calefactora a 45°C, durante 12 h, revisando posteriormente la contracción del líquido de Hoyer. Transcurrido este tiempo, se dejan en una estufa, a 60°C, durante una semana.

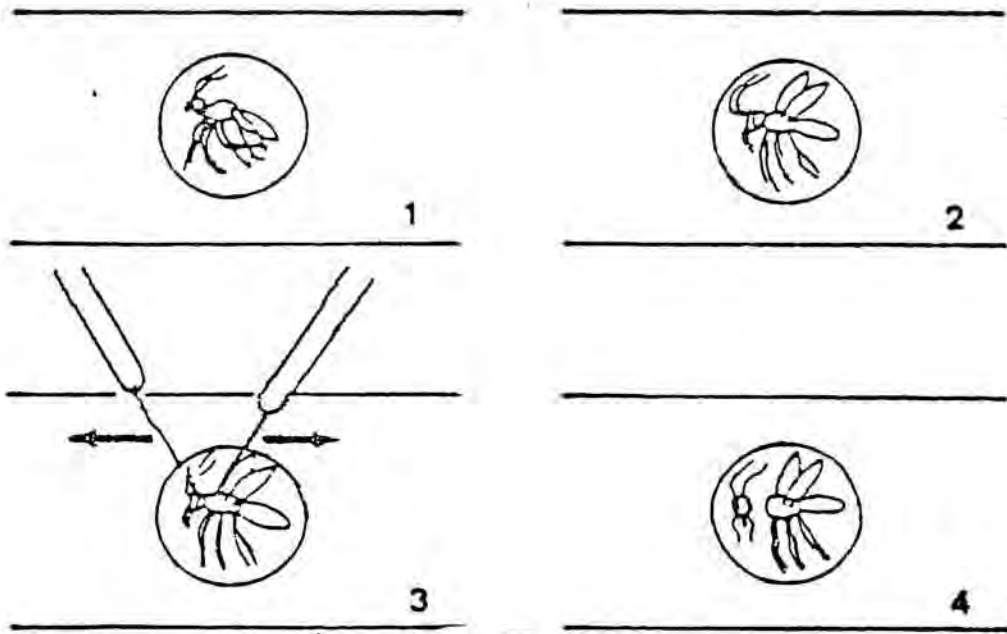


Fig. 19.- Esquema del montaje de los flebotomos

III.2.2.6.- IDENTIFICACIÓN

Las preparaciones, una vez secas, se han observado al microscopio (Leitz Laborlux 11), y se han identificado en base a sus caracteres morfológicos, siguiendo las claves de identificación elaboradas para las especies presentes en la Península Ibérica por Gállego Berenguer y col. (61) (Fig. 20 a y b).

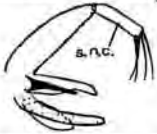




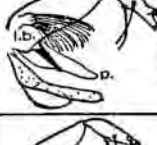



ESPECIES DE <i>Phlebotomidae</i> DE LA PENINSULA IBERICA (IMAGOS ♂)			
GENERO	SUBGENERO	Genitalia externa	ESPECIES
<i>Sergentomyia</i> Estilo con 4 espinas, todas terminales, y 1 seta no caduca (s.n.c.).	<i>Sergentomyia</i> Caracteres del género.		Seta no caduca en lóbulos de tercios medio y distal del estilo. Valvas perianas (v.p.) en dedo de guante. <i>S. (S.) mirata</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 lq. bomba genital.		V. pen. en forma de escudo, con punta roma. <i>P. (A.) masoicii</i>
	<i>Larrousius</i> Estilo corto; 5 espinas, 2 terminales. Tufo de setas del coxito (t.) con espinas implantadas directamente en su región media, sin lóbulo basal. Filamentos genitales 3-5x lq. bomba genital.		V. pen. dilatadas apicalmente, en badajo de cascana. <i>P. (L.) ariasi</i>
			V. pen. finas y alargadas, con extremo agudo, recto o muy ligeramente incurvado. <i>P. (L.) longicaupis</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). Parámeros (p.) unirráneos. Tufo de setas del coxito en un lóbulo basal (l.b.) bien desarrollado.		Estilo corto (lg.=3x.); solo 1 espina terminal. L. b. ensanchado apicalmente, con 20-25 setas largas. V. pen. de borcos casi paralelos y punta en proa de canoa. <i>P. (P.) alexandri</i>
<i>Phlebotomus</i> Estilo largo y delgado, con 5 espinas cortas (3 apicales + 2 submedianas). Parámeros trirrámicos.		Estilo corto (lg.=3x.); las 2 espinas apicales terminales, con bases a nivel subigual. L. b. largo y estrecho, con 5-10 s. largas. V. pen. con extremo afilado y transparente. <i>P. (P.) chabaudi</i>	
		Estilo muy corto (lg.=2x.); solo 1 espina terminal. L.b. largo y estrecho, con 5-20 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). Parámeros trirrámicos.		Tufo del coxito subapical y con 15 setas + pequeño l.b. con 9 setas cortas y finas. Surestilo con 2 espinas terminales espatuladas. V. pen. en forma de puñal. <i>P. (P.) papatasi</i>	

Fig. 20 a.- Clave de identificación de los flebotomos machos (tomado de 61)


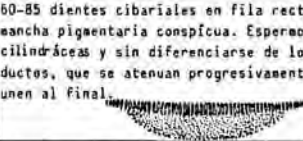
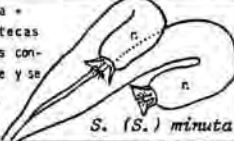


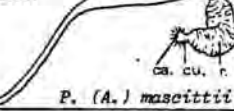
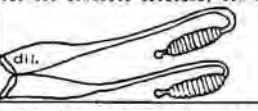
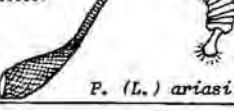
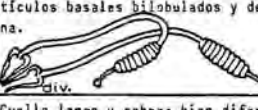




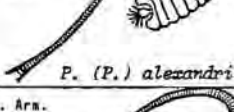
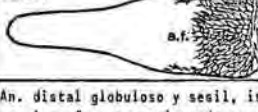
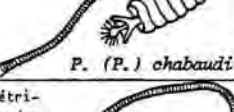

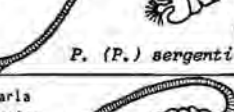

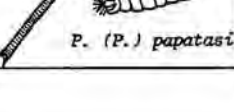
ESPECIES DE <i>Phlebotomidae</i> DE LA PENINSULA IBERICA (IMAGOS ♀)			
GENERO	SUBGENERO	CIBARIO / FARINGE / ESPERMOTECAS	ESPECIES
<p><i>Sergentomyia</i> Cibario armado con dientes (d.). Reservorio (r.) de la espermoteca liso.</p> 	<p><i>Sergentomyia</i> Con los caracteres del género.</p>	<p>60-85 dientes cibariales en fila recta - mancha pigmentaria conspicua. Espermotecas cilíndricas 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>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>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><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.) longicuspis</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. 20 b.- Clave de identificación de los flebotomos hembras (tomado de 61)

IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

En este capítulo se recogen los resultados obtenidos, en las dos localidades estudiadas, Torroja y Margalef, del estudio de la LCa y de los flebotomos vectores.

IV.1.- RESERVORIO CANINO

Los estudios llevados a cabo sobre el reservorio canino se han orientado al conocimiento de la prevalencia de la LCa y de la evolución de la enfermedad.

IV.1.1.- TORROJA

En la población de Torroja se han efectuado tres encuestas serológicas, una llevada a cabo en Mayo de 1991 y dos en 1992, durante los meses de Marzo y Mayo respectivamente. Las dos primeras han coincidido con las campañas de vacunación anti-rábica y la tercera fue llevada a cabo con objeto de aislar cepas del agente etiológico, *Leishmania infantum*, del reservorio canino.

En la Tabla 20 se indica, para cada perro y para cada muestra, su número de registro, edad, sintomatología y resultado serológico por la técnica Dot-ELISA.

Tal y como se ha indicado en el apartado III.1.1., pág. 30, el número de perros estudiados ha sido 38, obteniéndose un total de 70 muestras. Tan solo 9 de los animales (23,7%) han podido ser seguidos en los tres controles serológicos; de otros 14 perros (36,8%) han podido obtenerse dos muestras, y de los 15 restantes (39,5%) se ha obtenido una única muestra. Ello refleja la dificultad existente en la obtención de muestras para poder efectuar estudios epidemiológicos longitudinales en condiciones naturales.

Con respecto a la sintomatología, se han establecido tres grupos de animales, basándonos en las clasificaciones establecidas por Abranches y col. (6) y Mancianti y col. (112) y según los criterios siguientes:

O = asintomático: completa ausencia de síntomas y signos referibles a una infección por *Leishmania*.

+ = oligosintomático: adenopatía, pérdida de pelo y/o pelo hirsuto, onicogrifosis.

++ = sintomático: cuando presentan todos o varios de los signos severos de la enfermedad: alteraciones cutáneas (depilaciones, eczemas furfuráceos, úlceras), onicogriposis, queratoconjuntivitis, rigidez en las patas posteriores, caquexia)

Tabla 20.- LCa en la población de Torroja

05.1991				03.1992				05.1992			
N°	Edad	Sint.	Dot-ELISA	N°	Edad	Sint.	Dot-ELISA	N°	Edad	Sint.	Dot-ELISA
1	9m	0	neg	1	1a	0	neg	1	1a	0	neg
2	5a	0	1/800	2	6a	0	1/800	2	6a	++	1/1600
3	1a	0	1/100	3	2a	0	neg	3	2a	0	neg
4	2a	0	1/100	4	3a	0	1/100				
5	6a	0	1/200	5	7a	0	1/200	5	7a	0	1/100
6	5a	0	1/200	6	6a	0	1/400	6	6a	0	1/400
7	3a	0	1/100	7	4a	0	1/200				
8	8m	0	neg					8	1a	0	neg
9	11a	0	1/400					9	12a	+	1/200
10	4a	0	1/400					10	5a	+	1/800
11	2a	0	1/800					11	3a	++	1/3200
12	6a	0	neg								
13	11a	0	1/200	13	12a	0	1/400	13	12a	0	1/1600
14	3m	0	neg								
15	7a	0	1/100	15	8a	0	1/100	15	8a	0	1/100
16	3a	0	neg	16	4a	0	neg				
17	2a	0	1/400	exit.							
18	1a	0	1/400								
19	2a	0	1/100	19	3a	0	1/200	19	3a	0	1/200
20	10m	0	1/200	20	1a	0	neg	20	1a	0	neg
21	2a	0	1/100								
22	2a	0	neg								
				23	2a	0	1/100				
				24	1a	0	1/100	24	1a	0	1/100
				25	?	0	neg	25	?	0	neg
				26	2a	0	1/100	26	2a	0	neg
				27	6m	0	neg	27	8m	0	neg
				28	2a	+	neg	28	2a	+	neg
				29	5m	+	1/200	29	7m	+	neg
				30	17a	+	1/100				
				31	5a	++	1/6400	31	5a	++	1/6400
				32	2a	0	1/100				
				33	3a	0	neg				
				34	7a	0	1/800				
				35	14a	+	1/100				
				36	5a	0	1/100				
				37	?	++	1/6400				
								38	3a	+	1/400

N°: número de registro

0: asintomático

+: oligosintomático

++: sintomático

IV.1.1.1.- DISTRIBUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS Y PREVALENCIA

La distribución de los títulos de Ac anti-*Leishmania* obtenidos en las tres encuestas serológicas queda reflejada en la Tabla 21 y se resume, agrupando los resultados en negativos, dudosos (1/100-1/400) y positivos ($\geq 1/800$), en la Tabla 22.

Tabla 21.- Distribución de los títulos de Ac anti-*Leishmania* en los perros de Torroja en los tres periodos estudiados

"Dot-ELISA"	05.1991		03.1992		05.1992	
	N°	%	N°	%	N°	%
neg	6	27,3	8	29,6	9	42,9
1/100	6	27,3	9	33,3	3	14,3
1/200	4	18,2	4	14,8	2	9,5
1/400	4	18,2	2	7,4	2	9,5
1/800	2	9,1	2	7,4	1	4,8
1/1600	0	0	0	0	2	9,5
1/3200	0	0	0	0	1	4,8
1/6400	0	0	2	7,4	1	4,8
Total	22		27		21	

N: Número de animales

Tabla 22.- Prevalencia de la LCa en los tres periodos estudiados (Torroja)

"Dot-ELISA"	05.1991		03.1992		05.1992	
	N°	%	N°	%	N°	%
Negativo	6	27,2	8	29,6	9	42,9
Dudoso	14	63,6	15	55,6	7	33,3
Positivo	2	9,1	4	14,8	5	23,8
Total	22		27		21	

N: Número de animales

En los tres periodos estudiados el número de animales seropositivos no difiere estadísticamente ($\chi^2 = 1,65$, $p > 0,05$, g.l.: 2).

Es de remarcar el elevado número de animales con serologías intermedias que aparecen de forma constante, junto al bajo número de animales seronegativos.

IV.1.1.2.- MEDIA GEOMÉTRICA DE LA INVERSA DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS Y TÍTULO ARITMÉTICO MEDIO

La TGM y el TAM aparecen como una buena medida de la actividad enzoótica de la enfermedad en el espacio, ya que tienen en cuenta el total de los resultados inmunológicos sin necesidad de interpretarlos. Por ello pueden ser unos buenos índices para comparar los resultados serológicos en diferentes zonas, aunque no expresan en ningún momento la prevalencia de la enfermedad.

La TGM 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 diluidos (dilución 1/1) (102).

$$TGM = \text{antilog} \frac{\sum f (\log x)}{n}$$

n= población total

x= denominador del título

f= número de sueros de cada título

El TAM tiene el inconveniente de sobreestimar los valores elevados del denominador del título. Será tanto mayor cuanto mayor sea el número de sueros portadores de Ac a un título elevado. Por contra, no necesita ninguna convención para tener en cuenta los resultados negativos.

$$TAM = \frac{\sum (fx)}{n}$$

A pesar de ello, ambos índices tienen varias ventajas al ser aplicados a estudios epidemiológicos:

- No necesitan ninguna interpretación previa
- Tienen en cuenta todos los resultados inmunológicos
- No hacen intervenir el diagnóstico individual
- Pueden ser establecidos a partir de una sola encuesta epidemiológica

Se han calculado ambos índices en las tres encuestas serológicas realizadas (Tabla 23), obteniéndose valores elevados, tanto de la TGM (50,2, 48,8 y 35, respectivamente) como del TAM (209,0, 625,9 y 719,1, respectivamente), lo que corrobora la alta endemia canina en la población.

Tabla 23.- Valores de TGM y TAM en el municipio de Torroja

Fecha	TGM	TAM
05.1991	50,2	209,0
03.1992	49,8	625,9
05.1992	35,0	719,1

IV.1.1.3.-RELACIÓN DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO/DIAGNÓSTICO CLÍNICO

En la Tabla 24 se observa la relación existente entre los resultados serológicos obtenidos, expresados en títulos, y el diagnóstico clínico según los criterios expuestos en el apartado IV.1.1., pág. 58.

La Tabla resume los datos obtenidos de cada uno de los perros, durante las diversas encuestas, considerándolos como independientes.

Al agrupar los animales según sus títulos serológicos en animales con título negativo, animales con títulos serológicos dudosos, animales con títulos serológicos elevados que superan el umbral diagnóstico y relacionarlos con la sintomatología que presenta el animal (Tabla 25) se observa que:

Entre los *animales seropositivos*, con título significativo, considerados como afectados de una leishmaniosis evolutiva, 5/11 presentan sintomatología clara o sospechosa que nos indica la existencia de la enfermedad. El resto de los animales, 6/11 no presentan sintomatología o bien escasos síntomas (5/11 asintomáticos y 1/11 oligosintomáticos).

Tabla 24.- Resultados serológicos Dot-ELISA/sintomatología (Torroja)

Diagnóstico serológico	Diagnóstico clínico		
	0 N°	+	++ N°
neg	20	3	-
1/100	16	2	-
1/200	8	2	-
1/400	7	1	-
1/800	4	1	-
1/1600	1	-	1
1/3200	-	-	1
1/6400	-	-	3
total	56	9	5

Tabla 25.- Relación diagnóstico serológico/diagnóstico clínico (Torroja)

Diagnóstico serológico	Diagnóstico Clínico		
	0 n/N	+	++ n/N
Negativo	20/23	3/23	0/23
Dudoso	31/36	5/36	0/36
Positivo	5/11	1/11	5/11
Total	56/70	9/70	5/70

n/N: n° animales con las distintas sintomatologías/n° total de animales con los distintos títulos de Ac

Entre los animales con títulos intermedios, considerados como *animales dudosos*, la mayor parte de ellos son asintomáticos (31/36) y tan solo 5/36 presentan síntomas leves.

Entre los *animales seronegativos*, que serológicamente no son considerados como animales infectados, 20/23 son asintomáticos y 3/23 oligosintomáticos.

IV.1.1.4.- EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE LA ENFERMEDAD E INCIDENCIA

El seguimiento de la evolución serológica de los títulos de Ac anti-*Leishmania*, en el periodo aproximado de un año, se ha podido llevar a cabo sobre 16 animales.

En la **Tabla 26** se expresan los resultados individuales obtenidos para cada uno de los perros. Debemos indicar que en 1992, en que se efectuaron dos tomas de muestras, se han considerado los resultados obtenidos en el segundo control (Mayo) y, en su defecto, en el primero (Marzo). Se indica la presencia de un animal (nº 17), con título serológico 1/400 que ha sido exitus en este periodo.

Tabla 26.- Evolución de la LCa en la población de Torroja

Nº	1991		1992	
	Sint.	Dot-ELISA	Sint.	Dot-ELISA
1	0	neg	0	neg
2	0	1/800	++	1/1600
3	0	1/100	0	neg
4	0	1/100	0	1/100
5	0	1/200	0	1/100
6	0	1/200	0	1/400
7	0	1/100	0	1/200
8	0	neg	0	neg
9	0	1/400	+	1/200
10	0	1/400	+	1/800
11	0	1/800	++	1/3200
13	0	1/200	0	1/1600
15	0	1/100	0	1/100
16	0	neg	0	neg
17	0	1/400	Exitus	
19	0	1/100	0	1/200
20	0	1/200	0	neg

N: número de registro

En la Tabla 27 se expresan los resultados de la evolución serológica de los animales seguidos durante este periodo de un año que quedan resumidos en la Tabla 28.

Tabla 27.- Evolución serológica de la LCa en el periodo de 1 año (Torroja)

Serología previa	Control subsiguiente								
	neg	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	Exitus
neg	3/3	-	-	-	-	-	-	-	-
1/100	1/5	2/5	2/5	-	-	-	-	-	-
1/200	1/4	1/4	-	1/4	-	1/4	-	-	-
1/400	-	-	1/3	-	1/3	-	-	-	1/3
1/800	-	-	-	-	-	1/2	1/2	-	-
1/1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/3200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/6400	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 28.- Variación significativa de la tasa de Ac (Torroja)

Título inicial	Evolución serológica (título final)			
	∇	=	Δ	Exitus
neg		3/3		
1/100		5/5		
1/200	1/4(neg)	2/4	1/4(1/1600)	
1/400		2/3		1/3
1/800		1/2	1/2(1/3200)	
1/1600				
1/3200				
1/6400				
Total	1	13	2	1

=: Sin variación significativa del título de Ac.

Δ: Aumento significativo del título de Ac (mínimo dos titulaciones).

∇: Descenso significativo del título de Ac (mínimo dos titulaciones).

Al considerar como significativa la variación, como mínimo, de dos titulaciones, se observa que de los animales controlados uno presenta disminución del título de Ac, 13 mantienen el título, dos lo incrementan y uno es exitus.

Entre los animales *seropositivos* tan sólo han podido seguirse dos perros, incrementándose el título serológico en uno de ellos, que de 1/800 pasa a ser 1/3200 (animal nº 11).

Con respecto a los animales con *títulos de anticuerpos bajos*, se han seguido 12 perros que muestran una evolución dispar, representativa de las distintas posibilidades existentes: 9/12 animales mantienen el título de Ac en este periodo; 1/12 positiviza (animal nº 13, título inicial 1/200-control subsiguiente 1/1600), y 1/12 negativiza (animal nº 20, título inicial 1/200-control subsiguiente negativo).

Entre este grupo de animales hay uno que es exitus durante el periodo que transcurre entre el inicio del estudio y el control subsiguiente.

Por último, en el grupo de los *animales seronegativos*, los tres perros controlados han mantenido su titulación al cabo de un año.

La incidencia global, considerando como título diagnóstico de una leishmaniosis evolutiva el de 1/800 y teniendo en cuenta que 2/16 animales superan, en el periodo de un año, el umbral diagnóstico es de 12,5%. Sin embargo, al considerar que la variación de un título de Ac no es significativa, sólo 1/16 animales presenta un incremento significativo en el título (6,2%).

IV.1.1.5.- EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

En la Tabla 29 se resume la evolución clínica de la LCa de los 16 animales seguidos durante el periodo de un año, teniendo en cuenta que todos los animales fueron considerados asintomáticos en el primer control.

En los dos animales con *serología positiva* se observa que, en el periodo de un año, se produce un empeoramiento importante de su salud, pasando ambos de ser asintomáticos a sintomáticos.

Tabla 29.- Evolución clínica de la LCa en Torroja

Control inicial			Evolución clínica			
Serología	Sintom.	Nº	0	+	++	Exitus
Negativa	0	3	3	0	0	0
Dudosa	0	12	9	2	0	1
Positiva	0	2	0	0	2	0

N: número de animales

Entre los 12 animales con *serología dudosa* la evolución clínica de la enfermedad es heterogénea. Nueve de los 12 perros se mantienen asintomáticos. Dos presentan al cabo de un año uno de los síntomas que puede ser compatible con una leishmaniosis evolutiva, concretamente adenopatía de ganglio poplíteo, pasando a ser considerados animales oligosintomáticos (perros 9 y 10).

Con respecto a los dos animales *seronegativos* no se produce ningún cambio en su sintomatología, tal y como cabría esperar al no haberse producido variaciones en sus títulos serológicos (perros nº 1, 8 y 16).

IV.1.1.6.- AISLAMIENTO DE CEPAS DE *LEISHMANIA INFANTUM* DEL RESERVORIO CANINO

La tercera encuesta llevada a cabo en la población de Torroja tuvo como objetivo el aislamiento del agente etiológico, *Leishmania infantum*, del reservorio canino y poder así efectuar un estudio de la relación entre el título serológico obtenido y el aislamiento del parásito. Por otra parte, se pretendía ahondar en la controversia establecida actualmente, por parte de diversos autores, entre la infectividad de los perros con serología positiva pero sin presencia de síntomas.

Para ello, se procedió al cultivo de muestras de ganglio poplíteo, médula ósea y biopsia cutánea, tanto de piel sana como de las lesiones que pudieran observarse, de todos los perros que acudieron a la encuesta. Tan sólo en uno de los 21 animales no fue posible la realización de los cultivos.

En la Tabla 30 se muestran los resultados obtenidos, para cada uno de los animales, de la presencia de Ac anti-*Leishmania* y de los cultivos de las distintas muestras, así como su sintomatología.

Tabla 30.- Resultados de los cultivos de *Leishmania* de distintas muestras del reservorio canino (Torroja)

N° registro	Dot-ELISA	Sint.	Cult. ganglio	Cult. méd. ósea	Cult. piel sana	Cult. lesión
1	neg	0	neg	neg	neg	NR
2	1/1600	++	pos	NR	pos	NR
3	neg	0	neg ⁽¹⁾	neg	neg	NR
5	1/100	0	neg	neg	neg	NR
6	1/400	0	pos	pos	neg	NR
9	1/200	+	neg	neg	neg	NR
10	1/800	+	pos	neg	neg	NR
11	1/3200	++	pos	pos	neg	neg ⁽²⁾
13	1/1600	0	pos	pos	pos	NR
15	1/100	0	neg	neg	neg	NR
19	1/200	0	neg	neg	neg	NR
20	neg	0	neg ⁽¹⁾	neg	neg	NR
24	1/100	0	neg	neg	neg	NR
25	neg	0	neg	neg	neg	NR
26	neg	0	neg	neg	neg	NR
27	neg	0	neg	neg	neg	NR
28	neg	+	neg	neg	neg	neg ⁽³⁾
29	neg	+	neg	neg	neg	NR
31	1/6400	++	pos	pos	pos	NR
38	1/400	+	pos	pos	neg	NR

(1): Cultivo de ganglio submandibular

(2): Biopsia del dorso del cuello que presentaba descamación y alopecia

(3): Biopsia de úlcera en la región del vientre

NR: no realizado. En las biopsias de lesiones cutáneas es debido a la inexistencia de las mismas.

De todos los perros con serología positiva pudo aislarse el parásito, al igual que de los dos perros con título de Ac 1/400.

IV.1.2.- MARGALEF

En la población de Margalef, se han realizado dos encuestas serológicas, una en Mayo de 1991 y otra en Marzo de 1992; ambas han coincidido con la campaña de vacunación anti-rábica (Tabla 31).

Tabla 31.- LCa en la población de Margalef

1991				1992			
Nº	Edad	Sint.	Dot-ELISA	Nº	Edad	Sint.	Dot-ELISA
39	14 a	0	neg	39	15 a	0	neg
40	1 a	0	neg	40	2 a	0	neg
41	4 a	0	neg	41	5 a	0	neg
42	3 a	0	neg	42	4 a	+	neg
43	7 a	0	neg	43	8 a	0	neg
44	10 a	0	neg	44	11 a	+	neg
45	2 a	0	neg	45	3 a	0	neg
46	15 a	0	neg				
47	2 a	0	neg				
48	5 a	0	neg	48	6 a	0	neg
49	2 a	0	neg	49	3 a	0	neg
50	4 a	0	neg				
51	1 a	0	neg				
52	4 a	0	neg	52	5 a	0	neg
53	5 a	0	neg	53	6 a	0	neg
54	5 a	0	neg				
55	13 a	0	neg				
56	4 a	0	neg	56	5 a	0	neg
57	5 a	0	neg	57	6 a	0	neg
58	8 a	0	neg				
59	10 a	0	neg	59	11 a	+	neg
60	2 a	0	neg	60	3 a	0	neg
				61	11 m	0	neg
				62	3 a	0	neg
				63	1 a	0	neg
				64	1 a	+	neg

Nº: número de registro

Se han estudiado un total de 26 animales, 22 analizados en Mayo de 1991 y 19 en Marzo de 1992. De los 19 animales a los que se les efectuó la toma de sangre en 1992, 15 (79%) corresponden a seguimiento y 4 (21%) son animales controlados por primera vez. El número de muestras de sangre obtenidas ha sido de 41.

La totalidad de las muestras de los animales estudiados, en los dos años en la población de Margalef, son serológicamente negativas, lo que implica que la prevalencia de la enfermedad y la incidencia son nulas.

La ausencia total de títulos serológicos en los animales de esta localidad hace que los valores de la TGM y del TAM sean nulos.

Ante la negatividad serológica de la totalidad de los animales frente a *Leishmania* es interesante remarcar la existencia de 4 perros, que pese a ser seronegativos, presentan, de forma aislada, alguno de los síntomas que se relacionan generalmente con la enfermedad, como son depilaciones, pápulas y onicogriposis (Nº 42, 44, 59 y 64) (Ver Anexo 1).

De los 15 animales que han podido ser seguidos, ninguno presenta una evolución serológica al cabo de un año, permaneciendo como seronegativos.

En cuanto a la evolución clínica, en 1991 la totalidad de los perros eran asintomáticos y en el segundo control 2 perros pasan a ser oligosintomáticos (nº 44 y 59). Los animales presentaban depilaciones en distintas partes del cuerpo, lomo y patas traseras, y onicogriposis. El primero de los síntomas podía ser debido a la existencia de pulgas sobre ellos, hecho muy frecuente en estas zonas rurales. En cuanto a la onicogriposis, ésta podría ser consecuencia del mantenimiento de los perros en lugares cerrados.

IV.2.- FLEBOTOMO VECTOR

Los estudios llevados a cabo sobre los flebotomos se han orientado al conocimiento de su riqueza específica, abundancia, densidad y fenología.

Si bien, y tal como se indica en el enunciado de este apartado, se pretende hacer hincapié en el resultado de las especies vectoras de *Leishmania infantum*, se aportan también los resultados obtenidos con las otras especies de flebotomos capturadas.

IV.2.1.- TORROJA

En esta localidad se han colocado, durante todo el periodo de estudio (17.03.1991-20.01.1992), 780 PA, lo que representa una superficie de 31,2 m². A efectos del cálculo de la densidad total de los flebotomos, sólo se han tenido en cuenta los periodos con captura positiva, en alguna de las dos localidades estudiadas y para cualquiera de las especies de flebotomos capturados, lo que representa una superficie de 24,28 m².

IV.2.1.1.- ESTUDIO CUALITATIVO: RIQUEZA ESPECÍFICA

La riqueza específica indica, tal y como señalan Vattier-Bernard y Trouillet (210) el número de especies que componen una población. Está sujeta a variaciones, dependiendo del lugar de captura y de la época del año en que se ha efectuado. En Torroja, las especies capturadas e identificadas son cinco:

Phlebotomus (Larroussius) perniciosus Newstead, 1911

Phlebotomus (Larroussius) ariasi Tonnoir, 1921

Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti Parrot, 1917

Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi (Scopoli, 1786)

Sergentomyia (Sergentomyia) minuta (Rondani, 1843)

P. perniciosus, *P. ariasi* y *S. minuta* han sido citadas con anterioridad en esta localidad (55), y las dos primeras han sido señaladas como vectoras de la LCa (183). *P. sergenti* también ha sido capturada, con trampas CDC (M. Gállego, *com. pers.*), por lo que *P. papatasi* constituye una nueva cita.

IV.2.1.2.- ESTUDIO CUANTITATIVO

El número total de ejemplares capturados es de 3714 (Tabla 32), repartidos de la siguiente manera: 1984 *P. perniciosus*, 242 *P. ariasi*, 6 *P. sergenti*, 2 *P. papatasi* y 1480 *S. minuta*.

Tabla 32.- Número de flebotomos capturados y distribución por sexos en la localidad de Torroja

Especie	Machos		Hembras		Ginandromorfos		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<i>P. perniciosus</i>	1534	77,3	448	22,6	2	0,1	1984
<i>P. ariasi</i>	207	85,5	35	14,5	-	-	242
<i>P. sergenti</i>	6	100	0	0	-	-	6
<i>P. papatasi</i>	2	100	0	0	-	-	2
<i>S. minuta</i>	593	40,1	887	59,9	-	-	1480
Total	2342	63,1	1370	36,9	2	0,05	3714

De los 3714 ejemplares capturados, 2342 (63,1%) son machos y 1370 (36,9%) hembras. Esta mayor proporción de machos se cumple para todas las especies del género *Phlebotomus*: *P. perniciosus* (77,3%), *P. ariasi* (85,5%), *P. sergenti* (6/6) y *P. papatasi* (2/2). No ocurre lo mismo con *S. minuta*, de la que se aísla una mayor proporción de hembras (59,9%).

Es de destacar la presencia de dos ejemplares ginandromorfos de *P. perniciosus*, cuya descripción se incluye en el apartado IV.2.1.3., pág. 81.

A) ABUNDANCIA

Según Vattier-Bernard i Trouillet (210), el término abundancia se define como "el nº relativo de ejemplares de una determinada especie de flebotomo respecto al nº total de flebotómidos capturados". Este parámetro se expresa como porcentaje. Los mismos autores establecen la siguiente clasificación:

Especies muy comunes: superan el 50% de la colección

Especies comunes: entre el 25,1% y el 50%

Especies raras: entre el 10% y el 25%

Especies muy raras: inferior al 10%

Nuestros resultados nos permiten establecer la presencia de una única especie muy común, *P. perniciosus* (53,4%), una común, *S. minuta* (39,8%) y tres especies muy raras, *P. ariasi* (6,5%), *P. sergenti* (0,2%) y *P. papatasi* (0,05%) (Tabla 33).

Tabla 33.- Abundancia de los flebotomos en la localidad de Torroja

Especie	Abundancia (%)			
	Machos	Hembras	Ginandromorfos	Total
<i>P. perniciosus</i>	65,5	32,7	100	53,4
<i>P. ariasi</i>	8,8	2,5	-	6,5
<i>P. sergenti</i>	0,3	-	-	0,2
<i>P. papatasi</i>	0,1	-	-	0,05
<i>S. minuta</i>	25,3	64,7	-	39,8

Al analizar la abundancia de las especies de flebotomos según su sexo, se observa que si bien para los machos se cumple esta clasificación, no ocurre lo mismo con las hembras, en que *S. minuta* aparece como la especie más abundante (64,7%) frente a un 32,7% y un 2,5% para *P. perniciosus* y *P. ariasi*, respectivamente.

B) DENSIDAD

En todo estudio cuantitativo en el que se pretende comparar la fauna de flebotomos de distintas localidades, es imprescindible el cálculo de la densidad poblacional (Nº de flebotomos por m² de trampa adhesiva) (Tabla 34).

Tabla 34.- Densidad de los flebotomos (Torroja) (Sup.: 24,28 m²)

Especie	Densidad			
	Machos	Hembras	Ginandromorfos	Total
<i>P. perniciosus</i>	63,2	18,4	0,1	81,7
<i>P. ariasi</i>	8,5	1,4	-	10,0
<i>P. sergenti</i>	0,2	0	-	0,2
<i>P. papatasi</i>	0,1	0	-	0,1
<i>S. minuta</i>	24,4	36,5	-	60,9
Total	96,5	56,4	0,1	153,0

La densidad total de flebotomos es de 153 ejem./m² de trampa adhesiva, correspondiendo una densidad de 96,5 ejem./m² a los machos y de 56,4 ejem./m² a las hembras.

Como puede observarse, la especie con mayor densidad es *P. perniciosus* (81,7 ejem./m²), seguida de *S. minuta* (60,9 ejem./m²). Las especies restantes obtienen valores mucho mas bajos: *P. ariasi* (10 ejem./m²), *P. sergenti* (0,2 ejem./m²) y *P. papatasi* con una densidad de 0,1 ejem./m².

Biocca y col. (26) establecen unos índices de densidad que permiten clasificar a los flebotomos según especies presentes, especies con densidad media y especies con densidad alta:

<u>Densidad</u>	<u>Índices de densidad</u>
<8	Especies presentes
≥8≤32	Densidad media
>32	Densidad alta

De esta clasificación se desprende que, en la localidad de Torroja, existen dos especies con densidad alta, *P. perniciosus* y *S. minuta*, una especie con densidad media, *P. ariasi*, y dos especies presentes, *P. sergenti* y *P. papatasi*.

C) FENOLOGÍA

Los estudios fenológicos que se llevan a cabo sobre los flebotomos, basados en el cálculo de la densidad total y el porcentaje de machos con que se presentan en los distintos periodos de estudio, permiten discernir el número de generaciones de los mismos que aparecen durante el periodo de actividad. Los datos obtenidos, conjuntamente con el estudio de la edad fisiológica de las hembras de los flebotomos permiten, por otro lado, efectuar una estimación de las épocas de riesgo de transmisión y por lo tanto de adquisición de la leishmaniosis.

En nuestro caso, y tal como se ha indicado en el apartado de III.2., se ha efectuado un trampeo periódico, aproximadamente cada 15 días, expresándose a continuación los resultados obtenidos de las tres especies cuyo número de especímenes capturados ha permitido establecer su patrón fenológico (*P. perniciosus*, *P. ariasi* y *S. minuta*).

Phlebotomus perniciosus

P. perniciosus presenta un periodo de actividad de unos 7 meses. Los primeros ejemplares comienzan a aparecer hacia finales de Mayo-principios de Junio y su densidad va aumentando, de forma progresiva, hasta alcanzar un primer pico en la primera quincena de Julio (08.07/19.07.1991, D: 157,3 ejem./m²). A continuación se produce un descenso en la densidad, que se mantiene durante el mes de Agosto, para volver a aumentar, de forma brusca, durante la primera quincena de Septiembre dando lugar a un segundo pico poblacional, más acusado, a principios de Octubre (30.09/11.10.91, D: 288,6 ejem./m²). A partir de este momento empieza a descender la población hasta su total desaparición en el mes de Diciembre (Tabla 35, Fig. 21).

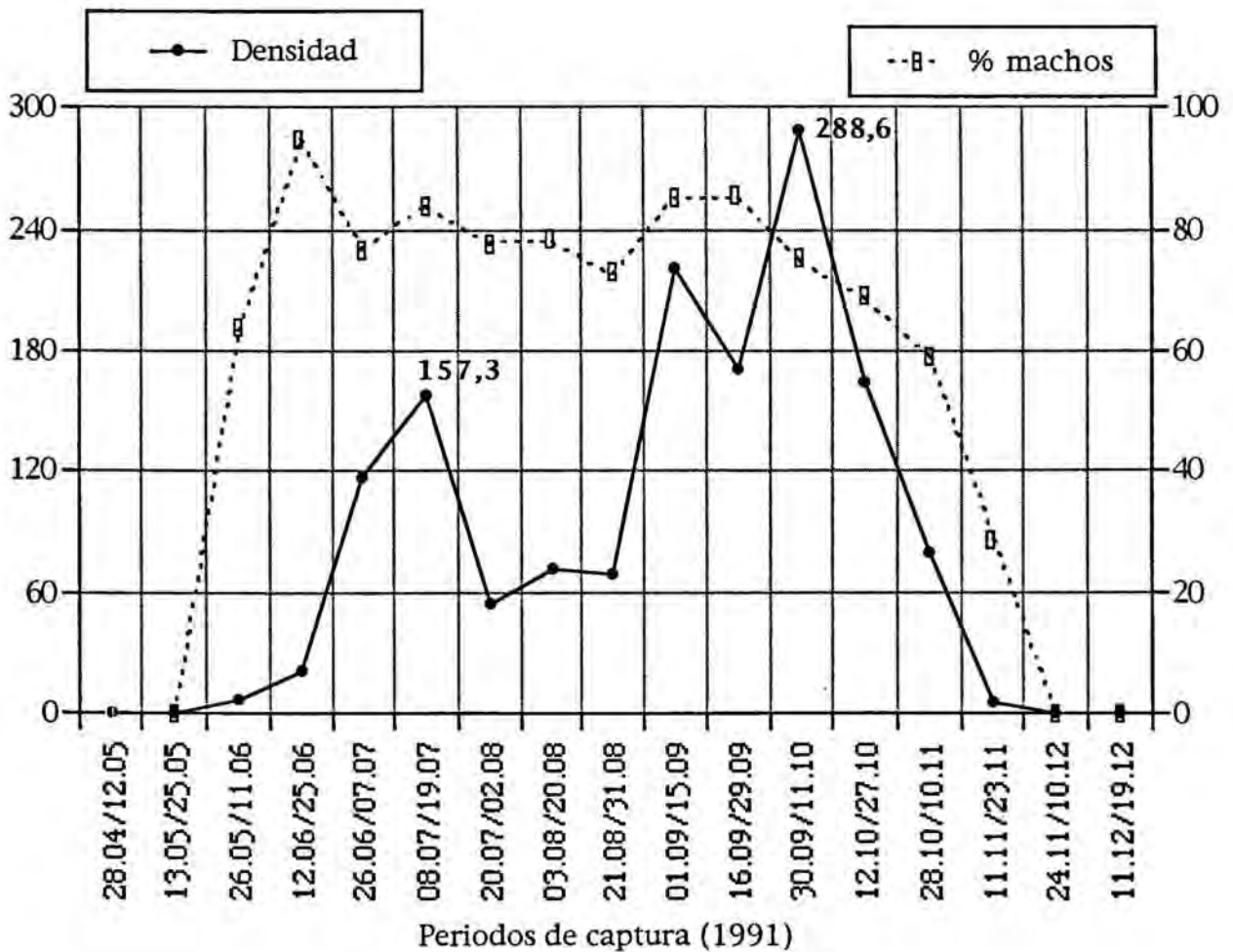
Esta evolución difásica es debida a la existencia de dos generaciones. La primera corresponde a la emergencia de adultos a partir de los estadios juveniles (larvas 4) que han permanecido en diapausa durante el invierno, y la segunda está relacionada con la eclosión de adultos que han tenido su desarrollo larvario durante la época estival.

Paralelamente, se ha realizado el análisis de la fluctuación de la proporción de machos a lo largo del estudio, buen indicador de la sucesión de generaciones debido a que, en los flebotomos, al igual que en muchos otros dípteros, los machos emergen y mueren también antes que las hembras (44, 45). En nuestro caso, el porcentaje de machos ha sido alto a lo largo del estudio, si bien se aprecia una ligera disminución durante el mes de Agosto y otra acusada a finales de Octubre, coincidiendo ambos descensos con las disminuciones en la población de *P. perniciosus*, hecho que corrobora la existencia de dos generaciones.

Estos resultados nos indican que la evolución de las larvas 4, tanto de aquellas que han permanecido en estado de diapausa durante el periodo invernal como de las que tienen su desarrollo durante el periodo estival, no tiene lugar de una forma uniforme y, por lo tanto, la eclosión de los adultos se produce de forma progresiva. También nos indicaría una superposición de las dos generaciones.

Tabla 35.- Densidad/porcentaje de machos de *P. perniciosus*-Torroja

Periodo	Densidad	% Machos
28.04/12.05	-	-
13.05/25.05	-	-
26.05/11.06	7,2	63,6
12.06/25.06	21,1	94,7
26.06/07.07	116,0	76,6
08.07/19.07	157,3	83,4
20.07/02.08	55,0	77,6
03.08/20.08	72,1	78,2
21.08/31.08	68,6	72,9
01.09/15.09	220,7	85,1
16.09/29.09	170,5	85,3
30.09/11.10	288,6	75,2
12.10/27.10	163,6	69,0
28.10/10.11	79,4	59,1
11.11/23.11	5,1	28,6
24.11/10.12	0,7	0
11.12/19.12	-	-
Total	81,7	77,3

Fig. 21.- Fenología de *P. perniciosus* en la localidad de Torroja

Phlebotomus ariasi

P. ariasi presenta un periodo de actividad de unos seis meses. Los primeros ejemplares empiezan a capturarse a finales de Mayo-principios de Junio, aumentando la densidad hasta alcanzar un primer pico a finales de Junio-principios de Julio (26.06/07.07.91, D: 22,92 ejem./m²). A continuación se observa una disminución en el número de capturas durante el mes de Agosto, para volver a incrementarse durante el mes de Septiembre, hasta presentar un segundo pico de densidad poblacional en la segunda quincena de este mes (16.09/29.09.91, D: 28,2 ejem./m²). A partir del mes de Octubre se produce una disminución progresiva de la población para llegar a desaparecer totalmente hacia mitades de Noviembre (Tabla 36, Fig. 22).

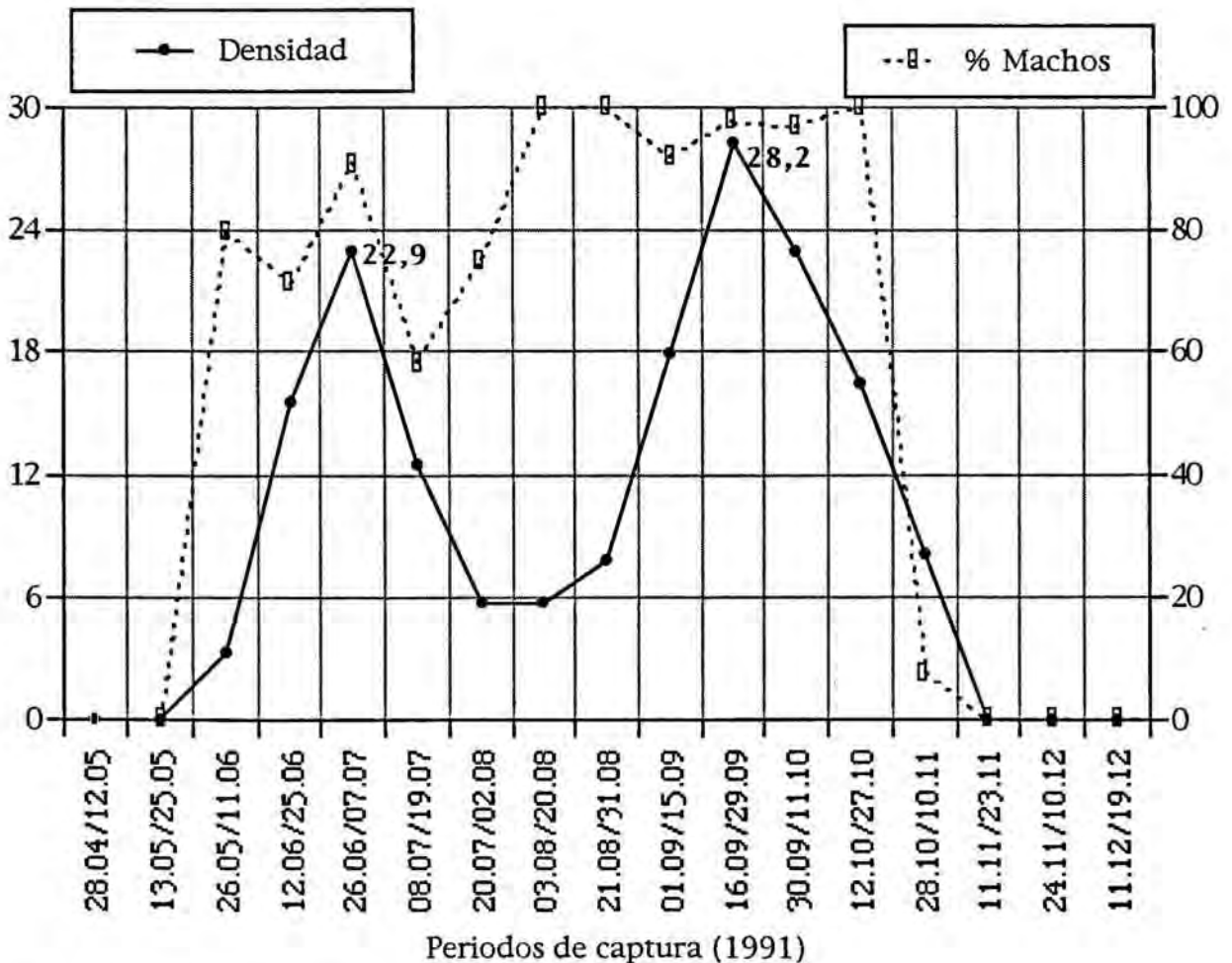
También ha sido elevada la proporción de machos capturados a lo largo de todo el estudio, resultado, seguramente, de la eclosión progresiva de los adultos y de la utilización de otros lugares de reposo por parte de las hembras.

Durante la primera quincena de Julio, momento en que se observa un descenso en la densidad de *P. ariasi*, se produce también una disminución en el porcentaje de machos (D: 12,5 ejem./m², % machos: 58,3), que vuelve a aumentar en la siguiente captura en que la densidad poblacional continua descendiendo (D: 5,7 ejem./m², % machos: 7,5). Ello nos indicaría una superposición entre las dos generaciones de esta especie.

Esta curva bimodal nos indica la existencia de dos generaciones durante el periodo de actividad de *P. ariasi*, al igual que ocurre con *P. perniciosus*, y que corresponden, como ha sido señalado, a la eclosión de adultos a partir de los estadios juveniles que han permanecido en diapausa durante el invierno y a la emergencia de adultos a partir de los estadios juveniles que tienen su desarrollo durante el verano.

Tabla 36.- Densidad/porcentaje de machos de *P. ariasi*-Torroja

Periodo	Densidad	% Machos
28.04/12.05	-	-
13.05/25.05	-	-
26.05/11.06	3,3	80,0
12.06/25.06	15,6	71,4
26.06/07.07	22,9	90,9
08.07/19.07	12,5	58,3
20.07/02.08	5,7	75,0
03.08/20.08	5,7	100
21.08/31.08	7,9	100
01.09/15.09	17,9	92,0
16.09/29.09	28,2	97,7
30.09/11.10	22,9	96,9
12.10/27.10	16,4	100
28.10/10.11	8,1	7,7
11.11/23.11	-	-
24.11/10.12	-	-
11.12/19.12	-	-
Total	10,0	85,5

Fig. 22.- Fenología de *P. ariasi* en Torroja

Sergentomyia minuta

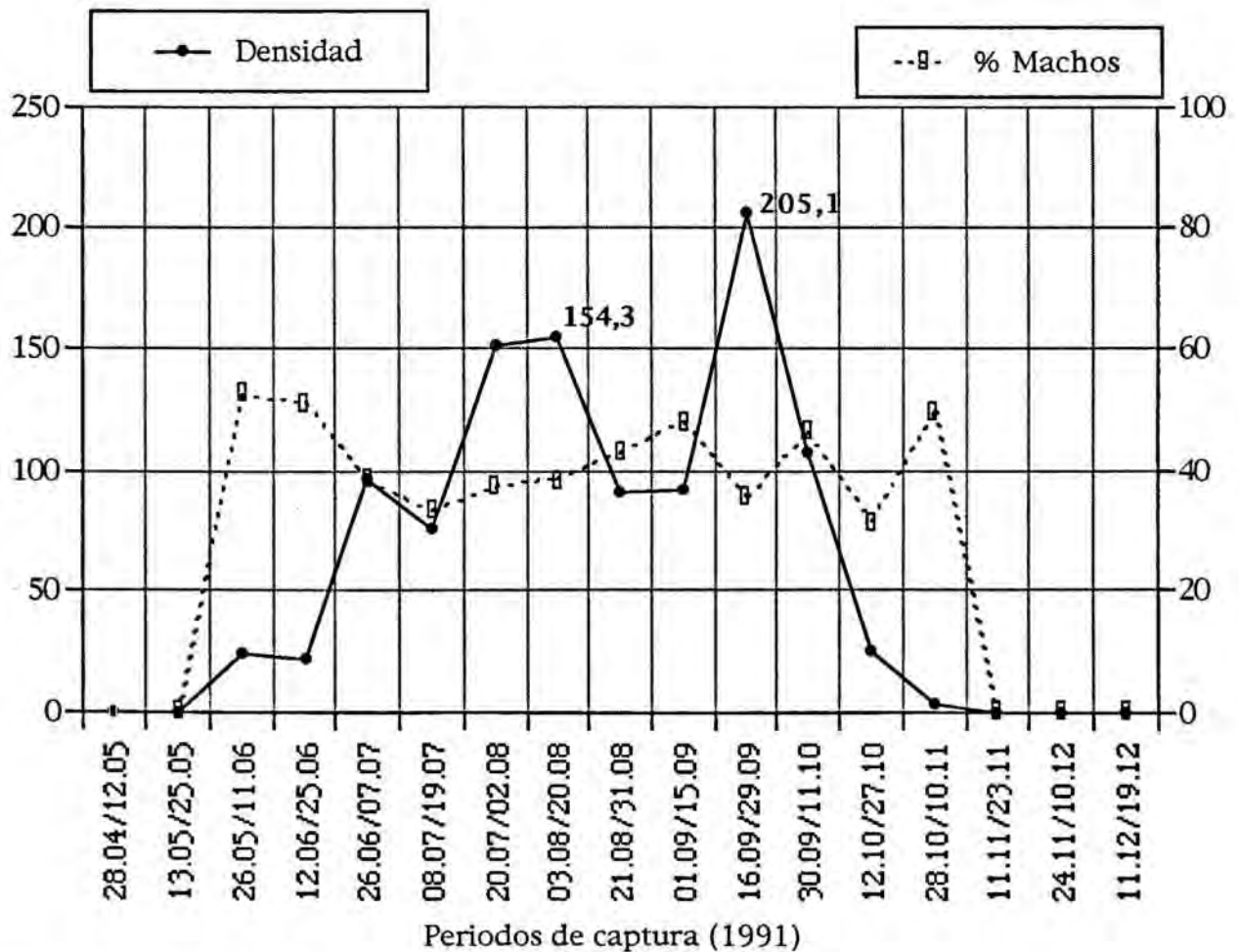
S. minuta presenta un periodo de actividad de seis meses. Los primeros ejemplares se empiezan a capturar a finales de Mayo-principios de Junio. El aumento de la población se produce de una forma progresiva, aunque algo irregular, hasta alcanzar un primer máximo en la primera quincena de Agosto (03.08/20.08, D: 154,4 ejem./m²). Posteriormente se produce un descenso en el número de capturas, que alcanza sus valores mínimos hacia finales de Agosto. A partir de este momento la población vuelve a aumentar hasta alcanzar un segundo máximo, más importante, en la segunda quincena de Septiembre (16.09/29.09.91, D: 205,1 ejem./m²). A continuación la población empieza a disminuir gradualmente, hasta desaparecer totalmente a mediados de Noviembre (Tabla 37, Fig. 23).

La actividad difásica de esta especie se pone de manifiesto al analizar la variación del porcentaje de machos. La eclosión de los adultos de la primera generación se corresponde con una elevada proporción de machos, que aparece al comienzo del periodo de actividad de esta especie (26.05/11.05.91, % machos: 52,8). Conforme la generación avanza y la población envejece, la proporción de machos disminuye, de forma progresiva, hasta presentar un valor mínimo a principios de Julio (08.07/19.07.91, % machos: 33,3). La eclosión de los individuos de la segunda generación se va realizando de un modo más progresivo y el porcentaje de machos aumenta, poco a poco, hasta volver a alcanzar un valor máximo (01.09/15.09, % machos: 46,7), que va a definir la aparición de la segunda generación de esta especie. A partir de este momento se sucede una serie irregular de eclosiones que hace fluctuar el porcentaje de machos.

Se ha podido observar que, en algunas especies, se produce una eclosión de adultos a partir de puestas cuyas larvas van a entrar en diapausa en su mayor parte. Dependiendo de las condiciones climáticas de la localidad, puede haber un pequeño número de larvas que continúan su desarrollo durante el mismo verano en que se realizó la puesta, mientras que las restantes entran en diapausa para continuar su desarrollo en la primavera siguiente. Estas eclosiones de adultos al final de la estación provocan una superposición de generaciones que se pone de manifiesto al observar una fluctuación irregular en la proporción de machos (Martínez-Ortega, *com. pers.*).

Tabla 37.- Densidad/porcentaje de machos de *S. minuta*-Torroja

Periodo	Densidad	% Machos
28.04/12.05	-	-
13.05/25.05	-	-
26.05/11.06	23,7	52,8
12.06/25.06	21,7	51,3
26.06/07.07	96,5	38,8
08.07/19.07	75,0	33,3
20.07/02.08	151,4	37,3
03.08/20.08	154,3	38,4
21.08/31.08	91,4	43,0
01.09/15.09	92,1	48,1
16.09/29.09	205,1	35,6
30.09/11.10	107,1	46,7
12.10/27.10	25,0	31,4
28.10/10.11	2,5	50,0
11.11/23.11	-	-
24.11/10.12	-	-
11.12/19.12	-	-
Total	60,9	40,1

Fig. 23.- Fenología de *S. minuta* en Torroja

Phlebotomus sergenti y *Phlebotomus papatasi*

Las capturas de *P. sergenti* y *P. papatasi* han sido esporádicas, hecho lógico si tenemos en cuenta que se han presentado con unas densidades y abundancias muy bajas. En la Tabla 38 se recogen las fechas en que ambas especies fueron aisladas.

Tabla 38.- Densidad/porcentaje de machos de *P. sergenti* y *P. papatasi* en Torroja

Periodo	<i>P. sergenti</i>		<i>P. papatasi</i>	
	Densidad	M/T	Densidad	M/T
28.04/12.05	-	-	-	-
13.05/25.05	-	-	-	-
26.05/11.06	-	-	-	-
12.06/25.06	-	-	-	-
26.06/07.07	-	-	-	-
08.07/19.07	-	-	-	-
20.07/02.08	2,1	3/3	-	-
03.08/20.08	1,4	2/2	1,4	2/2
21.08/31.08	-	-	-	-
01.09/15.09	-	-	-	-
16.09/29.09	-	-	-	-
30.09/11.10	0,7	1/1	-	-
12.10/27.10	-	-	-	-
28.10/10.11	-	-	-	-
11.11/23.11	-	-	-	-
24.11/10.12	-	-	-	-
11.12/19.12	-	-	-	-
Total	0,2	6/6	0,1	2/2

M/T: N° de machos/N° total de ejemplares

IV.2.1.3.- GINANDROMORFOS DE *PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS*

El estudio morfológico de todos los flebotomos capturados en la población de Torroja ha permitido el hallazgo de dos ejemplares ginandromorfos de *P. perniciosus*, uno de tipo masculino y otro de tipo femenino, que han sido objeto de una publicación (62).

A) GINANDROMORFO MASCULOIDE

Presenta la mayoría de los elementos de la genitalia masculina (coxitos y estilos, parámetros, bomba genital y filamentos genitales) perfectamente desarrollados. Las valvas penianas están bien conformadas, pero muestran una pequeña reducción en su longitud. El lóbulo lateral izquierdo o surestilo está normalmente desarrollado y el derecho muestra una marcada atrofia, alrededor del 30%. Los cercos están bien desarrollados. La ausencia de tres espinas en el estilo derecho y de dos en el izquierdo es debida, indudablemente, a causas mecánicas durante la recolección y/o montaje del ejemplar (Fig. 24 a).

La genitalia masculina se reduce a la presencia de la ínsula y de los lóbulos del esternito VIII, cuya apófisis espatulada aparece reducida, distorsionada y sin sus espinas apicales.

Debe señalarse que el extremo abdominal ha rotado 180°, mostrando la pinza genital un aspecto normal mientras que los lóbulos del esternito VIII presentan una posición anómala.

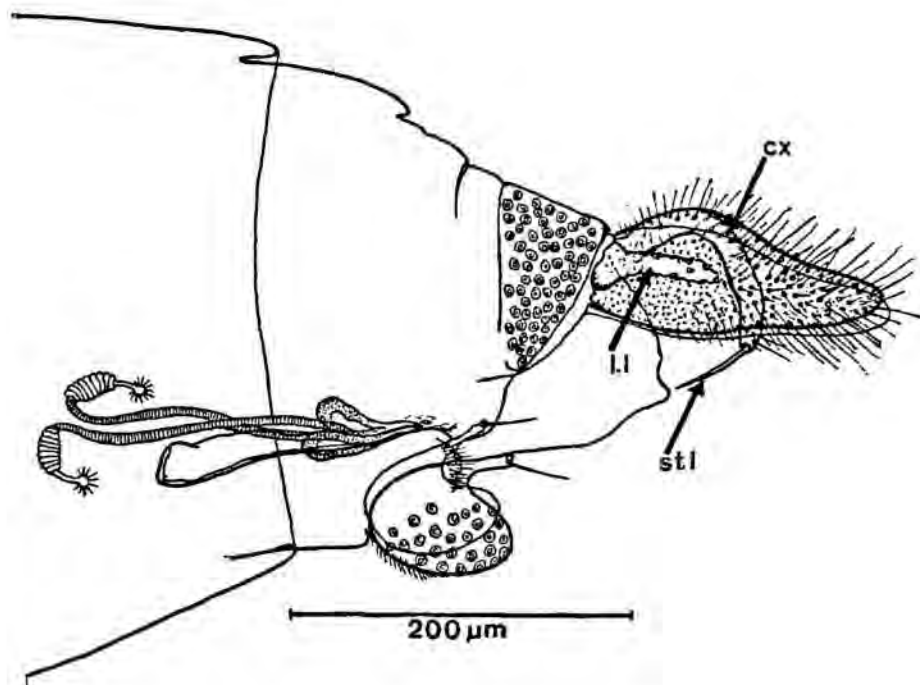
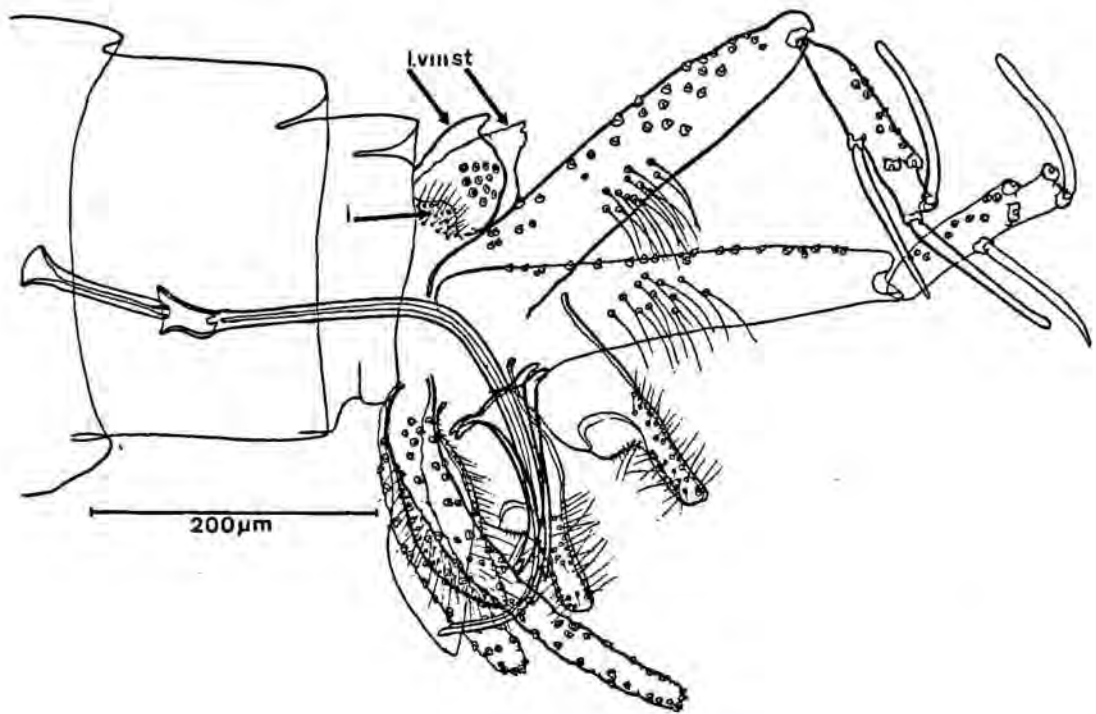
Las regiones de la cabeza son típicamente masculinas, así como la fórmula antenal.

B) GINANDROMORFO FEMINOIDE

Los elementos de la genitalia femenina (lóbulos del esternito VIII y sus apéndices espatulados y espinas apicales, ínsula furca, espermotecas con sus conductos y divertículos basales) están bien constituidos y normalmente desarrollados. Los cercos son también normales (Fig. 24 b).

La genitalia masculina está reducida a la presencia de un rodumentario lóbulo lateral izquierdo, mostrando un 90% de reducción y con la presencia de una única gonapófisis genital, la izquierda, con un coxito muy rodumentario, curvado y más corto que los cercos ("láminas medianas" para algunos autores). El estilo está representado por una formación espiniforme implantada en la región apical del coxito.

La ausencia de la cabeza no ha permitido la observación de los caracteres sexuales secundarios.



(cx: coxito, stl: estilo, l.l.: lóbulo lateral, i: insula, VIIIst: lóbulo del esternito VIII)

Fig. 24.- Ginandromorfos de *P. perniciosus*: ejemplar masculino (18a) y ejemplar femenino (18b) (tomado de 62)

IV.2.2.- MARGALEF

En esta población se han colocado 1049 trampas adhesivas desde el 17.03.1991 hasta el 20.01.1992, lo que representa una superficie total de 41,96 m². Al tener sólo en cuenta los periodos de captura positivos, la densidad es de 32,52 m².

IV.2.2.1.-ESTUDIO CUALITATIVO: RIQUEZA ESPECÍFICA

La riqueza específica de flebotomos en la localidad de Margalef es de cinco especies, las mismas que en Torroja.

Phlebotomus (Larrousius) perniciosus
Phlebotomus (Larrousius) ariasi
Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti
Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi
Sergentomyia (Sergentomyia) minuta

P. perniciosus, *P. papatasi* y *S. minuta* habían sido citadas con anterioridad (55) constituyendo *P. ariasi* y *P. sergenti* nuevas citas para Margalef.

IV.2.2.2.-ESTUDIO CUANTITATIVO

El n° total de ejemplares capturados en la localidad de Margalef es de 2416, repartidos de la siguiente manera: 695 *P. perniciosus*, 132 *P. ariasi*, 20 *P. sergenti*, 45 *P. papatasi* y 1524 *S. minuta* (Tabla 39).

Tabla 39.- Número de flebotomos capturados y distribución por sexos en la localidad de Margalef

Especie	Machos		Hembras		Total
	Nº	%	Nº	%	
<i>P. perniciosus</i>	631	90,8	64	9,2	695
<i>P. ariasi</i>	98	74,2	34	25,8	132
<i>P. sergenti</i>	16	80,0	4	20,0	20
<i>P. papatasi</i>	31	68,9	14	31,1	45
<i>S. minuta</i>	602	39,5	922	60,5	1524
Total	1378	57,0	1038	43,0	2416

El 57% de los ejemplares capturados son machos y un 43% hembras. Tan sólo en *S. minuta* el número de hembras aisladas (922) supera al de los machos (602).

A) ABUNDANCIA

Los resultados obtenidos nos permiten establecer tres grupos según la clasificación que establecen Vattier-Bernard i Trouillet (210) citada anteriormente. Un primer grupo está formado por *S. minuta* (63,1%) que se comporta como especie muy común, otro grupo está formado por *P. perniciosus* (28,8%) que aparece como una especie común y un tercer grupo recoge a tres especies consideradas como muy raras: *P. ariasi* (5,47%), *P. papatasi* (1,9%), *P. sergenti* (0,8%) (Tabla 40).

Tabla 40.- Abundancia de los flebotomos en la localidad de Margalef

Especie	Abundancia (%)		
	Machos	Hembras	Total
<i>P. perniciosus</i>	45,8	6,2	28,8
<i>P. ariasi</i>	7,1	3,3	5,5
<i>P. sergenti</i>	1,2	0,4	0,8
<i>P. papatasi</i>	2,2	1,3	1,9
<i>S. minuta</i>	43,7	88,8	63,1

Tal y como puede observarse en la Tabla, más de la mitad de los machos están representados por individuos del género *Phlebotomus*, mientras que un 88,8% de las hembras pertenecen a *S. minuta*.

B) DENSIDAD

La densidad total de flebotomos en la localidad de Margalef es de 74,3 ejem./m². Los machos se han capturado a razón de 42,3 ejem./m² y las hembras de 31,9 ejem./m².

La especie que presenta mayor densidad es *S. minuta* (46,9 ejem./m²), seguida de *P. perniciosus* (21,37 ejem./m²) y *P. ariasi* (4,1 ejem./m²). Las dos especies restantes tienen valores muy bajos: *P. sergenti* 0,6 ejem./m² y *P. papatasi* 1,4 ejem./m². (Tabla 41).

Tabla 41.- Densidad de los flebotomos (Margalef) (Sup.: 32,52 m²)

Especie	Densidad		
	Machos	Hembras	Total
<i>P. perniciosus</i>	19,4	2,0	21,4
<i>P. ariasi</i>	3,0	1,0	4,1
<i>P. sergenti</i>	0,5	0,1	0,6
<i>P. papatasi</i>	0,9	0,4	1,4
<i>S. minuta</i>	18,5	28,3	46,9
Total	42,3	31,9	74,3

Según la clasificación de índices de densidad establecida por Biocca y col. (26) hay una especie con densidad alta, *S. minuta*, una especie con densidad media, *P. perniciosus* y tres especies presentes *P. ariasi*, *P. sergenti* y *P. papatasi*.

C) FENOLOGÍA

Se ha podido establecer el patrón fenológico de tres especies: *P. perniciosus*, *P. ariasi* y *S. minuta*.

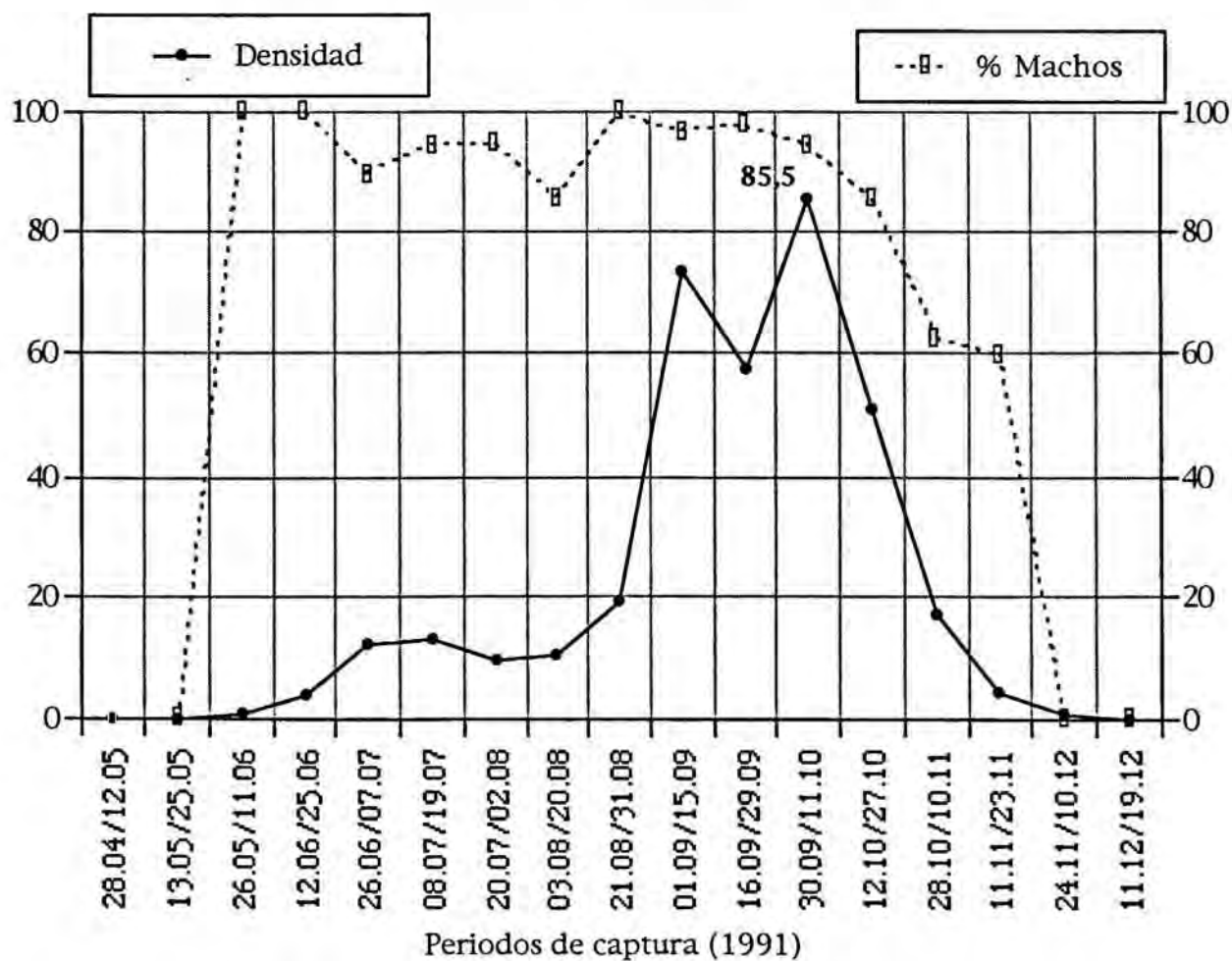
Phlebotomus perniciosus

P. perniciosus presenta un periodo de actividad de unos siete meses. Los primeros ejemplares empiezan a capturarse a finales de Mayo-principios de Junio, aumentando, moderadamente, su número durante los meses de Junio y Julio hasta que, a finales de Agosto, se produce un incremento importante en la población, alcanzando un pico de densidad poblacional durante los primeros días de Octubre (30.09/11.10.91, D: 85,5 ejem./m²) (Tabla 42, Fig. 25).

El estudio de la proporción de machos muestra que ésta es alta durante todo el estudio y que no se produce una disminución importante hasta el final de su periodo de actividad, lo que indica una emergencia progresiva de los adultos. También en esta localidad el enclave en el que se ha colocado las trampas es el hábitat de reposo utilizado por los machos, mientras que las hembras se dirigirán a otros lugares para satisfacer sus apetencias tróficas.

Tabla 42.- Densidad/porcentaje de machos de *P. perniciosus*-Margalef

Periodo	Densidad	% Machos
28.04/12.05	-	-
13.05/25.05	-	-
26.05/11.06	0,5	100
12.06/25.06	3,6	100
26.06/07.07	12,2	89,5
08.07/19.07	12,9	94,4
20.07/02.08	9,5	94,7
03.08/20.08	10,3	85,7
21.08/31.08	19,4	100
01.09/15.09	73,3	96,6
16.09/29.09	57,6	97,7
30.09/11.10	85,5	94,4
12.10/27.10	50,8	85,4
28.10/10.11	17,1	62,8
11.11/23.11	4,0	60,0
24.11/10.12	0,9	0
11.12/19.12	-	-
Total	21,4	90,8

Fig. 25.- Fenología de *P. perniciosus* en la localidad de Margalef

Si bien pudiera deducirse, dada la existencia de un único pico de densidad, que existe una única generación de esta especie, el hecho de que éste tenga lugar durante el mes de Octubre nos induce a deshechar esta teoría.

Por el contrario, creemos que ello sería debido a una elevada mortalidad de los flebotomos de la primera generación.

Phlebotomus ariasi

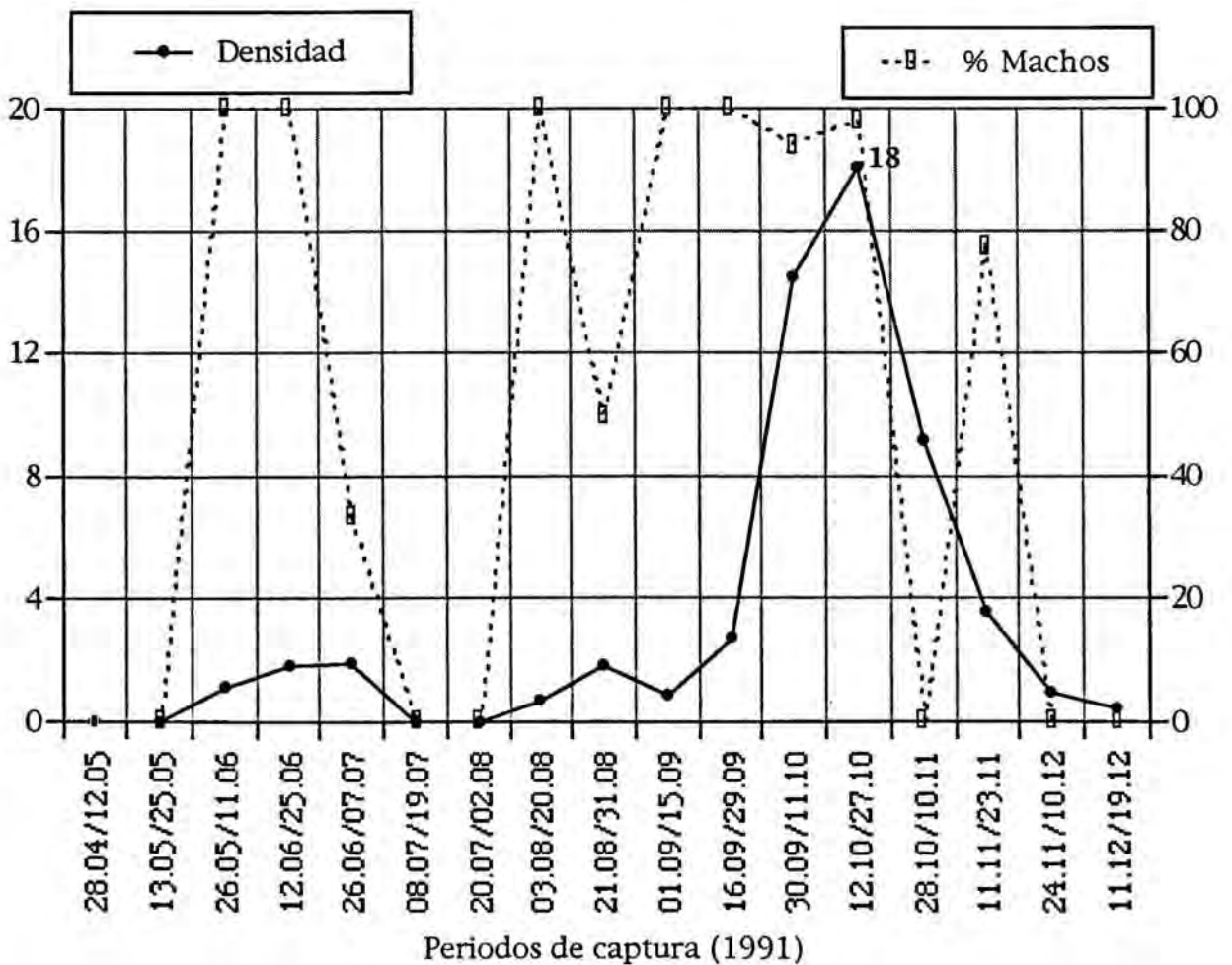
P. ariasi presenta un periodo de actividad de siete meses. Los primeros ejemplares aparecen, de forma aislada, desde finales de Mayo hasta principios de Julio. A partir de la primera quincena de Agosto, y hasta finales de Septiembre, el número de individuos capturados es muy bajo, hasta que en el mes de Octubre se produce un incremento alcanzando un pico de densidad poblacional en la segunda quincena de este mes (12.10/27.10.91, D: 14,5 ejem./m²). A continuación se produce una disminución de la densidad hasta que los ejemplares desaparecen a finales de Diciembre (Tabla 43, Fig. 26).

La proporción de machos ha sido elevada a lo largo del estudio si bien se observan oscilaciones, lo que indicaría una superposición de generaciones.

Al igual que en *P. perniciosus* sólo se observa un pico de máxima densidad. Sin embargo, al principio de su periodo de actividad se aprecia la presencia de una generación con densidades muy bajas debido, seguramente, a una elevada mortalidad.

Tabla 43.- Densidad/porcentaje de machos de *P. ariasi*-Margalef

Periodo	Densidad	% Machos
28.04/12.05	-	-
13.05/25.05	-	-
26.05/11.06	1,1	100
12.06/25.06	1,8	100
26.06/07.07	1,9	33,3
08.07/19.07	0	0
20.07/02.08	0	0
03.08/20.08	0,7	100
21.08/31.08	1,8	50,0
01.09/15.09	0,8	100
16.09/29.09	2,7	100
30.09/11.10	14,5	93,9
12.10/27.10	18,0	97,8
28.10/10.11	9,1	0
11.11/23.11	3,6	77,8
24.11/10.12	0,9	0
11.12/19.12	0,4	0
Total	4,1	74,2

Fig. 26.- Fenología de *P. ariasi* en la localidad de Margalef

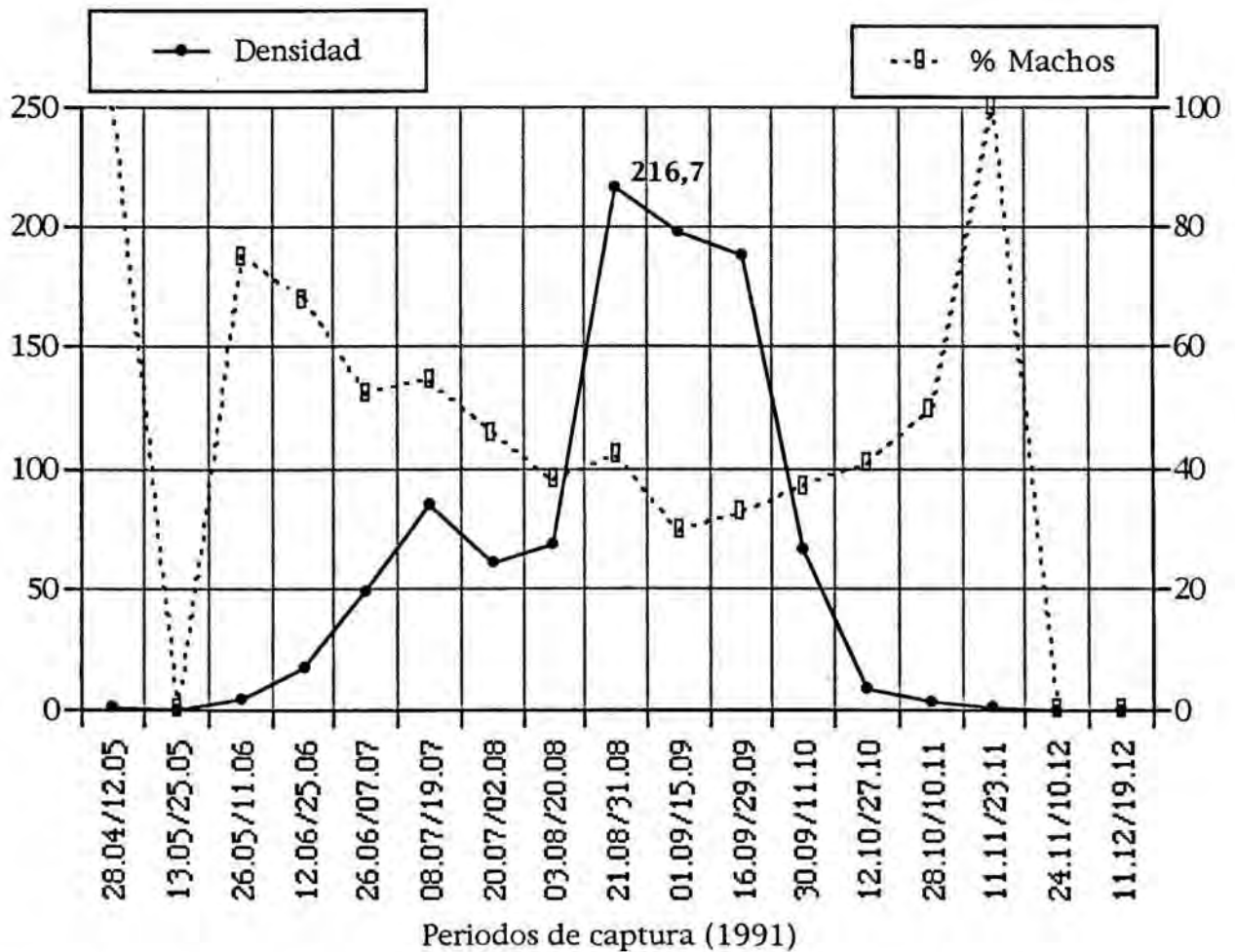
Sergentomyia minuta

S. minuta presenta un periodo de actividad de unos siete meses. Los primeros ejemplares se capturan a finales de Abril-primer quincena de Mayo y no se observa un aumento acusado de la población hasta mitades de Junio, para llegar a alcanzar un pico de densidad poblacional en la segunda quincena del mes de Agosto (21.08/31.08.91, D: 216,7 ejem./m²). A continuación se produce un descenso lento de la población hasta finales de Septiembre, y a partir de Octubre, se inicia una disminución brusca en el número de capturas, hasta que los ejemplares desaparecen totalmente a finales de Noviembre (Tabla 44, Fig. 27).

La curva de actividad que presenta *S. minuta* en Margalef es monofásica, con existencia de una única generación si bien, y tal como se observa a través de los datos obtenidos de la proporción de machos durante el estudio parece que se produzca una nueva eclosión de adultos a partir de la segunda quincena de Septiembre.

Tabla 44.- Densidad/porcentaje de machos de *S. minuta* -Margalef

Periodo	Densidad	% Machos
28.04/12.05	1,0	100
13.05/25.05	0	0
26.05/11.06	4,3	75,0
12.06/25.06	16,7	67,9
26.06/07.07	48,7	52,3
08.07/19.07	85,0	54,6
20.07/02.08	61,0	45,9
03.08/20.08	69,1	38,3
21.08/31.08	216,7	42,3
01.09/15.09	198,3	29,8
16.09/29.09	187,9	33,0
30.09/11.10	66,2	37,1
12.10/27.10	8,6	40,9
28.10/10.11	3,2	50,0
11.11/23.11	0,4	100
24.11/10.12	-	-
11.12/19.12	-	-
Total	46,9	39,5

Fig. 27.- Fenología de *S. minuta* en la localidad de Margalef

Phlebotomus sergenti y *Phlebotomus papatasi*

El bajo número de ejemplares capturados de ambas especies no permite establecer su patrón fenológico, por lo que nos limitaremos a citar su periodo de actividad que para *P. sergenti* es de tres meses y para *P. papatasi* de cuatro (Tabla 45).

Tabla 45.- Densidad/porcentaje de machos de *P. sergenti* y *P. papatasi* en Margalef

Periodo	<i>P. sergenti</i>		<i>P. papatasi</i>	
	Densidad	M/T	Densidad	M/T
28.04/12.05	-	-	-	-
13.05/25.05	-	-	-	-
26.05/11.06	-	-	-	-
12.06/25.06	-	-	-	-
26.06/07.07	-	-	4,5	7/7
08.07/19.07	1,4	2/2	5,7	5/8
20.07/02.08	0,5	1/1	2,0	3/4
03.08/20.08	1,5	2/2	2,2	3/3
21.08/31.08	9,3	7/10	1,8	2/2
01.09/15.09	0,8	1/1	7,5	8/9
16.09/29.09	0,9	2/2	2,2	2/5
30.09/11.10	0,9	1/2	2,6	1/6
12.10/27.10	-	-	0,4	0/1
28.10/10.11	-	-	-	-
11.11/23.11	-	-	-	-
24.11/10.12	-	-	-	-
11.12/19.12	-	-	-	-
Total	0,6	16/20	1,4	31/45

M/T: N° machos/N° total ejemplares

V.- DISCUSIÓN

V.- DISCUSIÓN

V.1.- RESERVORIO CANINO

El estudio llevado en las dos localidades del Priorat, Torroja y Margalef, sobre la LCa nos ha permitido corroborar la distribución heterogénea de la enfermedad en ellas.

La obtención de resultados negativos en la segunda de las poblaciones nos obliga a discutir en este apartado únicamente los resultados de Torroja.

V.1.1.- DISTRIBUCIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS Y PREVALENCIA

Las tres encuestas serológicas realizadas durante los años 1991 y 1992, han permitido detectar 2/22, 4/27 y 5/21 *animales seropositivos*, respectivamente. La seroprevalencia global de la LCa se ha situado en un 16%.

Estudios previos, utilizando la misma técnica serológica (Dot-ELISA-Prot A-PO), dieron como resultado una seroprevalencia global de 22,1% (años 1988, 1989 y 1990) (55). Ello nos lleva a considerar que la endemia canina es importante y se mantiene en el tiempo.

Abranches y col. (6) indican la dificultad que comporta comparar las prevalencias de distintos focos dada la disparidad de técnicas utilizadas, la heterogeneidad de criterios de interpretación cuando se utiliza una misma técnica serológica, la procedencia de los animales estudiados (zona endémica, consultas veterinarias, ...), etc., que muchas veces no se incluyen en los trabajos.

A pesar de ello, consideramos que la seroprevalencia hallada se puede considerar similar, e incluso superior, a la de otros focos del mediterráneo (Tablas 46 y 47).

Tabla 46.- Prevalencia de la LCa, en distintos focos europeos, mediante la técnica de IFI

País	Foco	P (%)	Referencias
Francia	Cévennes	1,3	103
	Pirineos Orientales	3,7	190
	Región de Tours	1,5	90
	Alpes Marítimos	10,0	135
	Córcega	6,7	191
Italia	Monte Argentario, Toscana	23,9	75
	Baccinello, Toscana	2,9	75
	Apulia, Sur de Italia	14,4	36
	Isla de Elba	19,1	111
	Isla de Elba	22,2	73
Portugal	Alto Douro (Alijó)	10-12,4	5
	Lisboa (zona rural)	11,6	3
	Lisboa (zona urbana)	3,8	3

P: prevalencia

Tabla 47.- Prevalencia de la LCa, en distintas localidades españolas, mediante la técnica de IFI

Localidad	Nº	P (%)	Tipo de muestra	Referencias
Barcelona y alrededores	417	29,5	Consultas vet.	33
Barcelona y alrededores	146	4,7	Ser. Vet. Loc	33
Baix Camp (Tarragona)	959	2,0	Campaña vacunación	163
Priorat (Tarragona)*	1169	10,0	Campaña vacunación	59
Mallorca, isla	1541	14,4	Consultas vet.	136
Menorca isla*	751	0,3	Campaña vacunación	202
Menorca, isla*	62	9,7	Consultas vet.	202
Valencia, provincia	289	12,8	Consultas vet.	109
Alicante, comarca	1174	23	Consultas vet.	38
Murcia región	167	39,5	Sospechosos	192
Zaragoza	1572	8,5	Azar	40
Castilla-La Mancha**	232	6,9	No indican	23
Castellón, ciudad	119	4,2	Perrera municipal	21
Salamanca, provincia	433	7,2	Azar	51
Cáceres, comarca	443	12,6	Azar	148
Madrid, com. autónoma	194	21,1	Albergue canino	82
Ribera Estellesa (Navarra)	3452	11,73	Campaña vacunación	193
Ribera Tuledana (Navarra)	6326	18,14	Campaña vacunación	193
Granada, provincia	1503	8,8	Azar	172
Córdoba, provincia**	540	23,7	Azar	123
Alpujarras (Granada)	627	5,7	Azar	7
Almería, provincia	240	25,0	Campaña vacunación	197
Almería, provincia	n.i.	9,0	Azar	198

* La técnica empleada es el Dot-ELISA

Nº: número de muestras estudiadas

P: prevalencia

** La técnica empleada es el ELISA

n.i.: no indicado

Ser. Vet. Loc.: Servicios de Veterinarios Locales

La presencia de un grupo importante de animales, en los tres periodos estudiados, con *serologías intermedias* (14/22, 15/27 y 7/21, respectivamente), que no alcanzan el valor diagnóstico ha sido también citada en otras zonas endémicas (4, 8).

Empleando la misma técnica serológica, estos valores no han sido hallados en Menorca, isla considerada libre de endemia (202). Ello nos indicaría que la existencia de estos títulos no es consecuencia de una inespecificidad de la técnica sino que puede ser reflejo de títulos propios del periodo prepatente de la enfermedad, de una baja respuesta humoral del hospedador (54), de contactos parásito hospedador que no han prosperado, de formas crípticas de la enfermedad e incluso reflejo de la memoria inmunológica de leishmaniosis regresivas.

El número de animales *seronegativos*, en los tres periodos estudiados, ha sido bajo (6/22, 8/27 y 9/21, respectivamente), lo cual es propio de zonas de alta endemia canina, donde el contacto parásito-hospedador es importante. Estos valores han sido también citados en otras zonas endémicas.

Los valores elevados de TGM y TAM hallados, en las tres encuestas, nos ratifican el elevado contacto que se produce entre el parásito y los perros.

V.1.2.- RELACIÓN DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO/DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Los resultados han mostrado que tan sólo el 45% de los animales considerados afectados de leishmaniosis por su título de Ac ($>1/800$) han presentado sintomatología clara. Ello puede ser reflejo del largo periodo de prepatencia de la enfermedad, que puede abarcar varios años, entre los animales afectados en zona endémica (6, 55, 57). En otros focos del mediterráneo se han hallado porcentajes que oscilan entre 10%-65% (75, 105, 111, 134).

Varios autores citan la independencia entre los títulos serológicos y los síntomas clínicos (55, 105, 112), mientras otros consideran que al aumentar el título aumenta la severidad de los síntomas (166).

En nuestro caso, parece observarse la presencia de sintomatología en aquellos animales que presentan títulos altos, frente a la ausencia de síntomas en los

animales con títulos bajos (Tabla 24, pág. 63), si bien el bajo número de animales estudiado no nos permite establecer conclusiones al respecto.

La existencia de perros oligosintomáticos entre los animales seronegativos (3/23 en Torroja y 4/41 en Margalef) es claro reflejo de la inespecificidad de los síntomas que se valoran (pequeñas lesiones en la piel, adenopatías, etc.), cuando éstas se presentan de una forma aislada., lo que, por otro lado, dificulta el diagnóstico clínico de la enfermedad.

V.1.3.- EVOLUCIÓN SEROLÓGICA Y CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD E INCIDENCIA

En el periodo de un año han podido seguirse dos perros *seropositivos* que han incrementado su título y que han sufrido un empeoramiento notable en su sintomatología, pasando del estado asintomático a ser considerados como animales sintomáticos.

En un caso, animal nº 2, se produce el aumento serológico no significativo de un título (1/800 \Rightarrow 1/1600) y los síntomas detectados son: adenopatía de ganglio poplíteo, llagas, úlceras en los codos y onicogriphosis. En el otro perro, nº 11, que presenta un aumento significativo en el título de Ac (1/800 \Rightarrow 1/3200) la sintomatología apreciada es más severa: depilaciones alrededor de los ojos y en las orejas, descamaciones, alopecia, hiperqueratosis, onicogriphosis, adenopatías, debilidad de las patas posteriores.

Fisa (55) considera que el 85% de los animales seropositivos, que superan el título diagnóstico, evolucionan negativamente en condiciones naturales, ya sea de modo crónico (68,2%, paulatinamente en varios años) o bien agudo o subagudo (31,8%, empeoramiento rápido que lleva a la muerte en menos de un año). En el 15% restante la evolución es positiva, observándose la regresión espontánea de la enfermedad en animales asintomáticos u oligosintomáticos.

Las formas regresivas han sido observadas por otros autores; así Lanotte y col. (105) citan un 10% de leishmaniosis de resolución espontánea en animales asintomáticos, frente a porcentajes mucho mayores, del 52%, citados por Pozio y col. (166).

En el periodo de un año se han seguido 12 animales con *títulos intermedios*, cuya evolución es heterogénea (Ver Tabla 26, pág. 64). La mayor parte de ellos (9/12) no han presentado variación significativa en el título de Ac y no se ha observado un empeoramiento clínico (7/9).

Tan sólo en dos perros, que poseían en el examen previo el título 1/400, muy próximo al título diagnóstico, ha podido observarse al cabo de un año la aparición de uno de los síntomas que puede ser compatible con una leishmaniosis, concretamente adenopatías en los ganglios poplíteos. Uno de los animales presenta una disminución no significativa en su título serológico (perro nº9, 1/400 \Rightarrow 1/200), mientras que el otro sufre un aumento de un título (perro nº10, 1/400 \Rightarrow 1/800) lo que, si bien no es significativo, representa alcanzar el umbral diagnóstico establecido, hecho que puede indicarnos que este animal evoluciona hacia una leishmaniosis patente.

En un caso (animal nº 13) se ha observado la seropositivación (1/200 \Rightarrow 1/1600) sin alteraciones en su estado de salud, lo que nos indica que el animal fue detectado en la fase inicial de la enfermedad durante el periodo de latencia.

Otro caso (animal nº 20) ha seronegativizado (1/200 \Rightarrow neg), sin evolucionar clínicamente. Este descenso en el título de Ac en un animal relativamente joven (10 meses) podría explicarse por el hecho de que los Ac le hubieran sido transmitidos por la madre, hecho que no hemos podido corroborar. Otra posibilidad sería que el animal, que nació durante la época estival (Julio), podría haber entrado en contacto con el parásito, sin que se instaurase la infección. También podría tratarse de un problema de inespecificidad de la técnica, ya que estamos considerando títulos muy bajos, aunque pensamos que ésta sería la posibilidad más remota dado que estos títulos no se encuentran en zona no endémica (201).

Esta seronegativización pudo ser observada en otro perro (animal nº 29, 1/200 \Rightarrow neg) que tan sólo pudo seguirse durante dos meses. Se trata de un animal que nació durante el mes de Octubre, por lo que, en principio, tendríamos que descartar que hubiera entrado en contacto con el parásito por picadura del vector. En este caso, el animal presentó llagas y depilaciones en las patas en los dos exámenes.

Por último un perro (animal nº 17) fue exitus en este periodo por causas desconocidas, sin que pueda descartarse una leishmaniosis como factor desencadenante del mismo ya que su título serológico era de 1/400.

Estos resultados coinciden con los observados en condiciones naturales por otros autores. Fisa (55) considera que en un 15% (6%-29%) estos títulos bajos representan la fase prepatente de la enfermedad, que se manifiesta en un incremento en la tasa de Ac. En el 85% de los casos (71-94%) las serologías se mantienen invariables durante un largo periodo de tiempo. En estos casos prodría tratarse de títulos de recuerdo de leishmaniosis autolimitadas, de la respuesta humoral a repetidas inoculaciones del parásito que no logran establecerse, de títulos propios de la fase de latencia de la enfermedad, cuyo periodo de incubación puede ser muy largo, incluso de varios años, o bien a la incapacidad del animal de producir una respuesta humoral importante (49, 54, 159).

Los animales *seronegativos* han representado un número bajo de los estudiados (3/17), sin que se haya detectado variación ni serológica ni clínica.

Se considera que la respuesta humoral puede jugar un cierto papel en la patogénesis de la enfermedad (34), pero su resolución depende, fundamentalmente, de la respuesta inmunitaria mediada por células (53), que está deprimida durante la infección (35, 39, 100, 159). La evolución de la infección parece estar determinada genéticamente, lo que se expresaría por la existencia de animales susceptibles y resistentes a la infección por *Leishmania infantum* (159).

La **incidencia** en la localidad de Torroja se ha situado en 6,2%, resultado comparable al hallado en estudios anteriores (7,2%) (55). La endemia en el foco se mantiene constante en la zona a lo largo de los años, como nos indican los datos de incidencia y prevalencia hallados después del seguimiento durante más de 5 años.

V.1.4.- AISLAMIENTO DE CEPAS DE LEISHMANIA

La visualización y/o aislamiento del parásito es el método de confirmación de la existencia de infección en el animal. Al relacionar los resultados de los cultivos de distintas muestras (ganglio poplíteo, médula ósea, piel sana, lesión cutánea), con la serología y la clínica que presentaron los animales, se observa que ha existido una

diferencia marcada en el éxito de los cultivos según la serología hallada (negativa, dudosa y positiva) y una escasa influencia de la sintomatología.

Los cinco perros con serología positiva dieron cultivo positivo de alguna de las muestras, y lo mismo ocurre con los dos animales con título de Ac anti-*Leishmania* 1/400, muy próximo al título serológico significativo de una leishmaniosis evolutiva. De ningún animal con títulos inferiores se ha aislado el parásito (Tabla 48).

Tabla 48.- Relación entre el título serológico y el cultivo de *Leishmania* (Torroja)

Título serológico	Cult. ganglio	Cult. méd. ósea	Cult. piel
neg	0/8	0/8	0/8
1/100	0/3	0/3	0/3
1/200	0/2	0/2	0/2
1/400	2/2	2/2	0/2
1/800	1/1	0/1	0/1
1/1600	2/2	1/1*	2/2
1/3200	1/1	1/1	0/1
1/6400	1/1	1/1	1/1

*En uno de los animales no fue posible realizar el cultivo de médula ósea

Diversos autores citan porcentajes de aislamientos mucho más bajos en conjunto, que oscilan alrededor del 50% (6, 55,59). Abranches y col. (6) y Lanotte y col. (105) consideran que el rendimiento del examen parasitológico mejora al incrementarse los títulos de Ac. Sin embargo, Fisa y col. (59), utilizando la técnica dot-ELISA, no observan variaciones importantes al incrementar el título.

Es de remarcar que esta positividad en los cultivos es independiente de la sintomatología que presentan los animales (Tabla 49). Así, de los 7 perros que dieron cultivo positivo dos eran asintomáticos, dos oligosintomáticos y tres sintomáticos.

Tal y como puede observarse, todos los animales tienen cultivo positivo de ganglio (7/7).

De los seis perros en que se pudo realizar el cultivo de médula ósea, cinco presentan cultivo positivo, entre ellos los dos animales asintomáticos y uno de los dos oligosintomáticos.

Tabla 49.- Relación existente entre la sintomatología y el cultivo de *Leishmania* (Torroja)

Sintomatología	Título serológico	Cult. ganglio	Cult. méd. ósea	Cult. piel
0	1/400	1/1	1/1	0/1
	1/1600	1/1	1/1	1/1
+	1/400	1/1	1/1	0/1
	1/800	1/1	0/1	0/1
++	1/1600	1/1	NR	1/1
	1/3200	1/1	1/1	0/1
	1/6400	1/1	1/1	1/1
Total		7/7	5/6	3/7

Por último, el cultivo de piel sana ha sido positivo en 3 de los siete animales, uno de los cuales era asintomático.

Ninguno de los dos cultivos de lesiones cutáneas ha dado resultado positivo. Un caso (animal n° 11) correspondía a un perro serológicamente positivo y con sintomatología clara; en el otro caso (animal n° 28) se trataba de un perro seronegativo con una úlcera en la región del vientre.

Abranches y col. (6) citan un 36,4% de aislamientos del parásito en lesiones cutáneas e indican su escaso valor epidemiológico. Adler y Theodor (10) mostraron que los flebotomos al picar una lesión cutánea eran afectados por contaminación bacteriana que era incompatible con el desarrollo de *Leishmania*.

El dato más importante, desde el punto de vista epidemiológico, ha sido el aislamiento de leishmanias a partir de cultivo de piel sana en animales seropositivos. Este hallazgo, ya citado por otros autores (6), junto con los resultados de Molina y col. (140), quienes consideran que los animales asintomáticos son capaces de infectar al flebotomo vector, puede hacer variar los conceptos sobre la epidemiología y el control de la leishmaniosis tanto canina como humana (50, 87).

V.2.- FLEBOTOMOS VECTORES

V.2.1.- ANÁLISIS CUALITATIVO

La riqueza específica de los flebotomos de Torroja y Margalef, constituida por cinco especies, es pobre si tenemos en cuenta que, en España, se han aislado un total de 12 especies de flebotomos (42, 61, 70, 146, 194) (Fig. 28):

- Género *Phlebotomus*
 Subgénero *Larroussius*
 ● *P. (P.) perniciosus*
 ■ *P. (L.) ariasi*
 ◆ *P. (L.) longicuspis*
 △ *P. (L.) langeroni*
 Subgénero *Adlerius*
 ▣ *P. (A.) mascittii*
 Subgénero *Paraphlebotomus*
 □ *P. (P.) sergenti*
 ★ *P. (P.) alexandri*
 ☆ *P. (P.) chabaudi*
 Subgénero *Phlebotomus*
 ● *P. (P.) papatasi*
 Subgénero *Abonnencius*
 ☒ *P. (A.) fortunatorum*
- Género *Sergentomyia*
 ○ *S. minuta*
 ⊗ *S. fallax*



Fig. 28.- Mapa de distribución de los flebotomos en España (modificado de 61 y 70)

De éstas, dos, *P. fortunatorum* y *S. fallax*, tan sólo han sido citadas en las Islas Canarias, siendo la primera endémica de estas islas, y la otra es propia del N de África.

También presentan una distribución geográfica fundamentalmente norteafricana *P. langeroni*, *P. longicuspis*, *P. alexandri* y *P. chabaudi*. La primera de ellas ha sido encontrada, recientemente, en la Comunidad de Madrid y las tres restantes tienen limitada su distribución a las zonas áridas sudorientales de la Península Ibérica (provincias de Alicante, Murcia, Almería y Granada).

Con respecto a *P. mascittii*, de distribución transpirenaica, septentrional, ha sido citada únicamente en el NE peninsular (zonas de Camprodón-Gerona y Montseny-Barcelona).

Es por ello que no es de extrañar la ausencia de todas estas especies en las dos localidades del Priorat objeto de nuestro estudio.

En resumen, la fauna de flebotomos de Torroja y Margalef está constituida por aquellas especies que presentan una distribución geográfica más amplia en la Península Ibérica. Una de ellas, *P. papatasi*, es una especie con afinidades bioclimáticas áridas; *P. sergenti* prefiere zonas semiáridas y áridas y; *P. perniciosus* y *S. minuta*, las especies más ubiquistas, se localizan preferentemente en zonas semiáridas y subhúmedas y, por último, *P. ariasi* se localiza fundamentalmente en zonas más húmedas.

Como ya se ha comentado en el apartado IV.2. de Resultados, todas las especies habían sido citadas con anterioridad en la comarca del Priorat (55).

V.2.2.- ANÁLISIS CUANTITATIVO

A través del análisis cuantitativo, de los flebotomos de Torroja y Margalef, se observa que el porcentaje de hembras capturadas, por el método de PA, es siempre inferior al de los machos para todas las especies del género *Phlebotomus*, no ocurriendo lo mismo con *S. minuta*, especie de la que el porcentaje de hembras es ligeramente superior al de los machos.

Estos resultados son totalmente comparables a los obtenidos, al utilizar este tipo de trampas, por otros investigadores en distintos focos de leishmaniosis de España (Tabla 50).

Tabla 50.- Datos comparativos de la proporción de hembras de flebotomos en distintas zonas de España (método de captura: PA)

Ref.	Procedencia	<i>P.pn.</i>	<i>P.ar.</i>	<i>P.s.</i>	<i>P.pp.</i>	<i>S.m.</i>
P.t.	Torroja	22,6	14,5	0	0	59,9
P.t.	Margalef	9,2	25,8	20,0	31,1	60,5
119	Pradell	13,8	0	-	-	78,0
63	Pradell	29,2	0	-	-	72,7
55	Priorat	13,1	22,2	8,3	14,2	67,5
138	Baix Llobregat	8,0	8,0	50,0	-	47,8
196	Montserrat y alrededores	9,5	12,3	25,0	-	52,2
30	Barcelona	10,0	15,0	-	-	53,0
177	Camprodón y Montseny	10,6	9,7	4,0	-	65,5
67	Lérida	9,7	11,9	9,7	21,1	43,7
106	Zaragoza	26,1	7,1	20,0	36,1	45,1
42	Comunidad de Madrid	4,2	4,1	9,4	13,7	65,3
51	Salamanca	10,9	4,4	0	-	67,0
126 ¹	Murcia, Alicante, Almería	4,0	4,2	11,6	16,5	57,5
199 ²	Almería	9,2	10,3	16,4	16,6	41,6
145	Granada	11,0	8,7	23,4	16,1	41,6
108	Mallorca	9,1	-	12,0	-	51,6
201	Menorca	6,9	-	10,1	-	48,7

P.pn.: *P. perniciosus*

P.ar.: *P. ariasi*

P.s.: *P. sergenti*

P.pp.: *P. papatasi*

S.m.: *S. minuta*

P.t.: presente trabajo

1: utiliza preferentemente PA, pero también TL (CDC) para la captura de flebotomos vivos

2: utiliza como trampas PA con y sin luz

Estos porcentajes varían cuando se utilizan otros métodos de captura, tales como TL, trampas con cebo (humano o distintos animales), etc., debido al fototropismo positivo que presentan algunas de las hembras del género *Phlebotomus*, muy marcado en el caso de *P. ariasi*, y a su antropofilia (Tabla 51).

Este hecho también ha podido observarse en Torroja. Al comparar los resultados obtenidos en un estudio precedente, realizado en Julio de 1986, y llevado a cabo por miembros de nuestra Unidad de Parasitología y del LEM (M. Gállego, *com. pers.*). A través de este estudio puede observarse que tanto las hembras de *P. perniciosus* como las de *P. ariasi* presentan un fototropismo positivo, siendo estadísticamente significativas las diferencias observadas en el número de capturas según el tipo de trampa empleada (*P. perniciosus*: $\chi^2 = 114,6$, $p < 0,001$, g.l.:1; *P. ariasi*: $\chi^2 = 72,3$; $p < 0,001$, g.l.: 1). En cambio, no se observan diferencias en los resultados obtenidos con *P. sergenti* ($\chi^2 = 0$, $p > 0,05$, g.l.:1) y *S. minuta* ($\chi^2 = 0,6$, $p > 0,05$, g.l.: 1).

Tabla 51.- Datos comparativos de la proporción de hembras de flebotomos en distintas zonas de España según el tipo de trampas empleadas

Ref.	Procedencia	Trampa	<i>P.pn.</i>	<i>P.ar.</i>	<i>P.s.</i>	<i>P.pp.</i>	<i>S.m.</i>
*	Torroja	PA	17,6	18,2	23,8	-	55,7
		TL	53,7	65,6	33,3	-	40,1
29	Barcelona, ciudad	PA	32,0	16,0	-	-	57,0
		TL	18,0	70,0	-	-	40,0
29	Barcelona, TB-89-3	PA	19,6	13,2	-	-	56,7
		TL	50,3	69,5	-	-	37,5
106	Zaragoza	PA	26,1	7,1	20,0	36,1	45,1
		TL	13,5	-	-	16,7	44,5
		CA	43,4	66,7	-	-	100
		AS	23,6	33,3	-	-	40,0
42	Comunidad de Madrid	PA	4,2	4,1	9,4	13,7	65,3
		TL	39,2	-	-	-	83,8
124	Murcia	PA	4,9	4,8	5,2	24,0	83,7
132		TL	31,0	15,6	44,3	53,8	40,5
		CH	94,6	100	96,0	99,0	-
126	Murcia, Alicante, Almería	PA ¹	4,0	4,2	11,6	16,5	57,5
133	Alicante, Murcia	TL/CH	62,5	28,5	37,5	69,5	81,8
201	Menorca, isla	PA	6,9	-	10,1	-	48,7
		TI	32,0	-	-	-	31,0
201	Menorca, Sa Teulera	PA	31,0	-	-	-	9,0
		TL	30,1	-	-	-	30,8

P.pn.: *P. perniciosus*

P.ar.: *P. ariasi*

P.s.: *P. sergenti*

P.pp.: *P. papatasi*

S.m.: *S. minuta*

CA: cebo animal (conejo)

AS: aspirador boca

CH: cebo humano

*: datos de un estudio realizado en 1986 y no publicado (M. Gállego, *com. pers.*)

1: utiliza preferentemente PA, pero también TL (CDC) para la captura de flebotomos vivos

A) ABUNDANCIA

Al comparar la abundancia de las distintas especies capturadas en las dos localidades se observa que en Torroja la especie más abundante es *P. perniciosus* (53,4%) seguida de *S. minuta* (39,8%), mientras que en Margalef se invierten estos resultados (*S. minuta*: 63,1%, *P. perniciosus*: 28,8%). Las restantes especies obtienen valores de abundancia bajos en ambas poblaciones (Tabla 52).

Estos resultados son comparables a los obtenidos en otros focos de leishmaniosis por otros autores. Tan sólo en las Islas Canarias, zona no endémica, la abundancia

de *P. perniciosus* y *S. minuta* es inferior a la de otras especies de flebotomos (*P. fortunatorum* y *S. fallax*).

Tabla 52.- Datos comparativos de la abundancia (%) de flebotomos en distintas zonas de España (método de captura: PA)

Ref.	Procedencia	<i>P.pn.</i>	<i>P.ar.</i>	<i>P.s.</i>	<i>P.pp.</i>	<i>S.m.</i>	Otros	Nº
P.t.	Torroja	53,4	6,5	0,2	0,05	39,8	-	3714
P.t.	Margalef	28,8	5,5	0,8	1,9	63,1	-	2416
65	Pradell de la Teixeta	6,1	0,5	-	-	93,4	-	3002
63	Pradell de la Teixeta	2,3	0,1	-	-	97,6	-	1026
55	Priorat	16,9	3,0	0,3	0,2	79,7	-	4542
138	Baix Llobregat	9,7	1,1	0,04	-	89,1	-	4486
196	Montserrat y alrededores	19,6	5,6	0,7	-	74,1	-	2190
30	Barcelona	13,4	0,2	-	-	86,4	-	5676
177	Camprodón y Montseny	4,2	5,0	1,1	-	89,5	0,2	4482
67	Lérida	23,0	17,4	2,8	1,6	52,8	-	5596
43	Cataluña	11,9	7,0	1,6	-	79,5	0,005	13555
106	Zaragoza	16,3	0,1	0,02	0,4	83,2	-	19665
42	Comunidad de Madrid	44,7	0,7	2,6	1,0	50,8	0,2	31161
51	Salamanca	42,9	11,0	0,1	-	45,9	-	3269
126 ¹	Murcia, Alicante, Almería	39,0	5,7	13,0	12,0	24,7	4,5	15700
199 ²	Almería	30,0	2,2	3,3	7,3	56,4	0,9	20760
145	Granada	25,5	8,4	1,0	0,2	64,8	0,1	14191
108	Mallorca	24,0	-	1,3	-	74,7	-	1957
202	Menorca	19,6	-	5,4	-	75,0	-	3851
131	Tenerife	0,3	-	4,0	-	13,9	81,8	303

P.pn.: *P. perniciosus*

P.ar.: *P. ariasi*

P.s.: *P. sergenti*

P.pp.: *P. papatasi*

S.m.: *S. minuta*

Nº: nº de flebotomos capturados

P.t.: presente trabajo

1: utiliza preferentemente PA, pero también TL (CDC) para la captura de flebotomos vivos

2: utiliza como trampas PA con y sin luz

Otros: Se incluyen en otras especies de flebotomos las que tienen una distribución geográfica más limitada (*P. mascittii*, *P. alexandri*, *P. chabaudi*, *P. fortunatorum* y *S. fallax*)

A través de los resultados obtenidos podría extraerse la conclusión de que *P. perniciosus* presenta una importancia epidemiológica mayor que *P. ariasi* en la transmisión de *L. infantum* en la zona estudiada. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela, ya que estudios anteriores, en los que se utilizaron como método de captura las TL, muestran que las proporciones relativas de las especies de flebotomos varían considerablemente, disminuyendo la abundancia de *S. minuta* y aumentando, de forma muy acusada, la de *P. ariasi*, de tal

manera que, en algún foco (Barcelona), la especie dominante pasa a ser *P. ariasi* seguida de *P. perniciosus* (Tabla 53).

Tabla 53.- Datos comparativos de la abundancia (%) de flebotomos en distintas zonas de España según el tipo de trampas empleadas

Ref.	Procedencia	Trampa	<i>P.pn.</i>	<i>P.ar.</i>	<i>P.s.</i>	<i>P.pp.</i>	<i>S.m.</i>	Otros	N°
*	Torroja	PA	49,7	16,1	8,8	-	25,5	-	479
		TL	57,0	39,1	0,1	-	3,8	-	5326
29	Barcelona, ciudad	PA	10,0	1,0	-	-	89	-	18133
		TL	16,9	78,5	-	-	4,6	-	1315
32	Barcelona, TB-89-3	PA	2,8	0,5	-	-	96,8	-	6797
		TL	12,2	84,0	-	-	2,8	-	1157
106	Zaragoza	PA	16,3	0,1	0,02	0,4	83,2	-	19665
		TL	63,1	0,4	-	1,1	35,4	-	539
		CA	86,4	10,2	-	-	3,4	-	88
		AS	61,7	12,9	-	-	25,4	-	630
42	Comunidad de Madrid	PA	44,7	0,7	2,6	1,0	50,8	0,2	31161
		TL	71,8	-	-	-	26,1	2,0	142
124	Murcia	PA	12,8	6,6	51,9	3,9	24,2	0,5	632
132		TL	21,8	6,9	63,4	4,3	2,5	1,1	4502
126	Murcia, Alicante, Almería	PA ¹	39,0	5,7	13,0	12,0	24,7	4,5	15700
133		TL/CH	65,3	5,5	4,2	18,2	2,8	3,9	380
201	Menorca, isla	PA	28,6	-	2,1	-	69,3	-	9747
		TL	80,6	-	0,4	-	19,0	-	273
32	Menorca, Sa Teulera	PA	59,3	-	-	-	40,7	-	1167
		TL	80,1	-	-	-	19,9	-	261

P.pn.: *P. perniciosus*

P.ar.: *P. ariasi*

P.s.: *P. sergenti*

P.pp.: *P. papatasi*

S.m.: *S. minuta*

CA: cebo animal (conejo)

AS: aspirador boca

CH: cebo humano

*: datos de un estudio realizado en 1986 y no publicado (M. Gállego, com. pers.)

1: utiliza preferentemente PA, pero también TL (CDC) para la captura de flebotomos vivos

Otros: Se incluyen en otras especies de flebotomos las que tienen una distribución geográfica más limitada (*P. mascittii*, *P. alexandri*, *P. chabaudi*, *P. fortunatorum* y *S. fallax*)

Por otro lado, la importancia epidemiológica de *P. ariasi* en la transmisión de leishmanias, aún cuando su abundancia al ser capturada con PA y TL sea menor que la de *P. perniciosus*, quedó demostrada en un estudio efectuado en la localidad de Torroja. Se diseccionaron 1088 hembras de *P. ariasi* y 1415 de *P. perniciosus*, presentando unos porcentajes de parasitación por *L. infantum* mayor la primera

que la segunda (0,7% y 0,3%, respectivamente) (183), si bien la diferencia no es estadísticamente significativa ($\chi^2= 1,4451$, $p > 0,05$, g.l.: 1).

Estos hechos han propiciado que varios autores indiquen la necesidad de la utilización conjunta de varios métodos de captura, en un mismo foco, cuando se intenta incriminar una o varias especies de flebotomos en la transmisión de leishmanias (29, 61).

Botet (29) señala que, en Barcelona, las diferencias observadas son debidas a que al efectuarse el trampeo de flebotomos en mechinales se captura masivamente a *S. minuta*, especie para la cual, y en la Península Ibérica, éstos constituyen no sólo su lugar de refugio sino también de alimentación y reproducción, ya que en ellos habitan las lagartijas y salmanquesas a partir de las que efectúan la ingesta de sangre. En el caso de *P. perniciosus* el autor señala que el alto porcentaje de machos que se capturan en estos mechinales indica que los mismos constituyen el lugar de reposo diurno, no siendo hábitat ni de reproducción ni de alimentación de las hembras, dado el bajo número con que se capturan. Por último, y con respecto a *P. ariasi* indica que los agujeros de estos muros no constituyen ni su hábitat, ni su refugio ni su lugar de alimentación y reproducción, dado el bajo número que se capturan tanto de machos como de hembras; la captura de esta especie, mediante el uso de PA, sería de forma excepcional.

B) DENSIDAD

Tal y como puede observarse en la Tabla 54, la densidad de flebotomos ha sido mayor en Torroja que en Margalef, si exceptuamos a *P. sergenti* y *P. papatasi*, especies que, al igual que *S. minuta*, no juegan ningún papel en la transmisión de *L. infantum*.

Estas diferencias han sido estadísticamente significativas para todas las especies a excepción de *P. ariasi* (*P. perniciosus*: $\chi^2= 12,22$, $p < 0,001$, g.l.: 1; *P. ariasi*: $\chi^2= 0,0000281$, $p > 0,05$, g.l.: 1; *P. sergenti*: $\chi^2= 4,008$, $p < 0,001$, g.l.: 1; *P. papatasi*: $\chi^2= 6,06$, $p < 0,001$, g.l.: 1; *S. minuta*: $\chi^2= 7,37$, $p < 0,001$, g.l.: 1).

Los resultados muestran que, en Torroja, *P. perniciosus*, alcanza una densidad superior a los obtenidos en otras zonas de España; tan sólo en la provincia de Salamanca se obtiene una densidad similar para esta especie. La densidad que

presenta, en ésta localidad, *P. ariasi* sólo es superada en las provincias de Lérida y Salamanca y, muy ligeramente, en Granada.

En Margalef, *P. perniciosus* presenta valores de densidad no despreciables al compararlos con los obtenidos en otras zonas de la Península Ibérica, mientras que *P. ariasi* obtiene valores intermedios a los hallados en otras zonas.

Tabla 54.- Datos comparativos de la densidad de flebotomos en distintas zonas de la Península Ibérica (método de captura: PA)

Ref.	Procedencia	<i>P.pn.</i>	<i>P.ar.</i>	<i>P.s.</i>	<i>P.pp.</i>	<i>S.m.</i>
P.t.	Torroja	81,7	10,0	0,2	0,1	60,9
P.t.	Margalef	21,4	4,1	0,6	1,4	46,9
65	Pradell	21,7	1,9	-	-	337,1
55	Priorat	23,8	4,2	0,4	0,2	111,9
138	Baix Llobregat	9,7	1,2	0,04	-	89,3
196	Montserrat y alrededores	9,0	2,5	0,3	-	33,9
29	Barcelona y Sierra de Collcerola	5,1	0,6	-	-	45,2
177	Camprodón y Montseny	1,9	2,3	0,5	-	11,1
67	Lérida	22,2	15,2	2,4	1,4	46,1
106	Zaragoza	14,6	0,4	0,02	0,2	63,7
51	Salamanca	77,2	19,9	0,1	-	82,6
143	Granada	35,2	11,5	1,3	0,3	89,4
202	Menorca	14,9	-	4,1	-	57,0

P.pn.: *P. perniciosus*

P.ar.: *P. ariasi*

P.s.: *P. sergenti*

P.pp.: *P. papatasi*

S.m.: *S. minuta*

P.t.: presente trabajo

1: utiliza preferentemente PA, pero también TL (CDC) para la captura de flebotomos vivos

2: utiliza como trampas papeles adhesivos con y sin luz

C) FENOLOGÍA

La actividad, en las dos localidades estudiadas, de *P. perniciosus*, *P. ariasi* y *S. minuta* ha tenido lugar coincidiendo con amplio rango de temperaturas (T mín. de 1°C y T máx. de 35°C). Sin embargo, las dos primeras especies se han visto afectadas cuando se han registrado temperaturas máximas superiores a los 30°C, disminuyendo o no incrementando su densidad (Figs. 29 y 30).

La influencia negativa, que tienen las condiciones termohigrométricas del verano sobre la actividad de estas especies, caracterizadas por una elevada temperatura y

un descenso de la humedad relativa del aire ya había sido observada en otras zonas de la Península Ibérica: Barcelona (29), sureste peninsular (Murcia, Alicante, Almería) (129), y en Menorca (201).

S. minuta, en cambio, no parece verse afectada durante la época canicular.

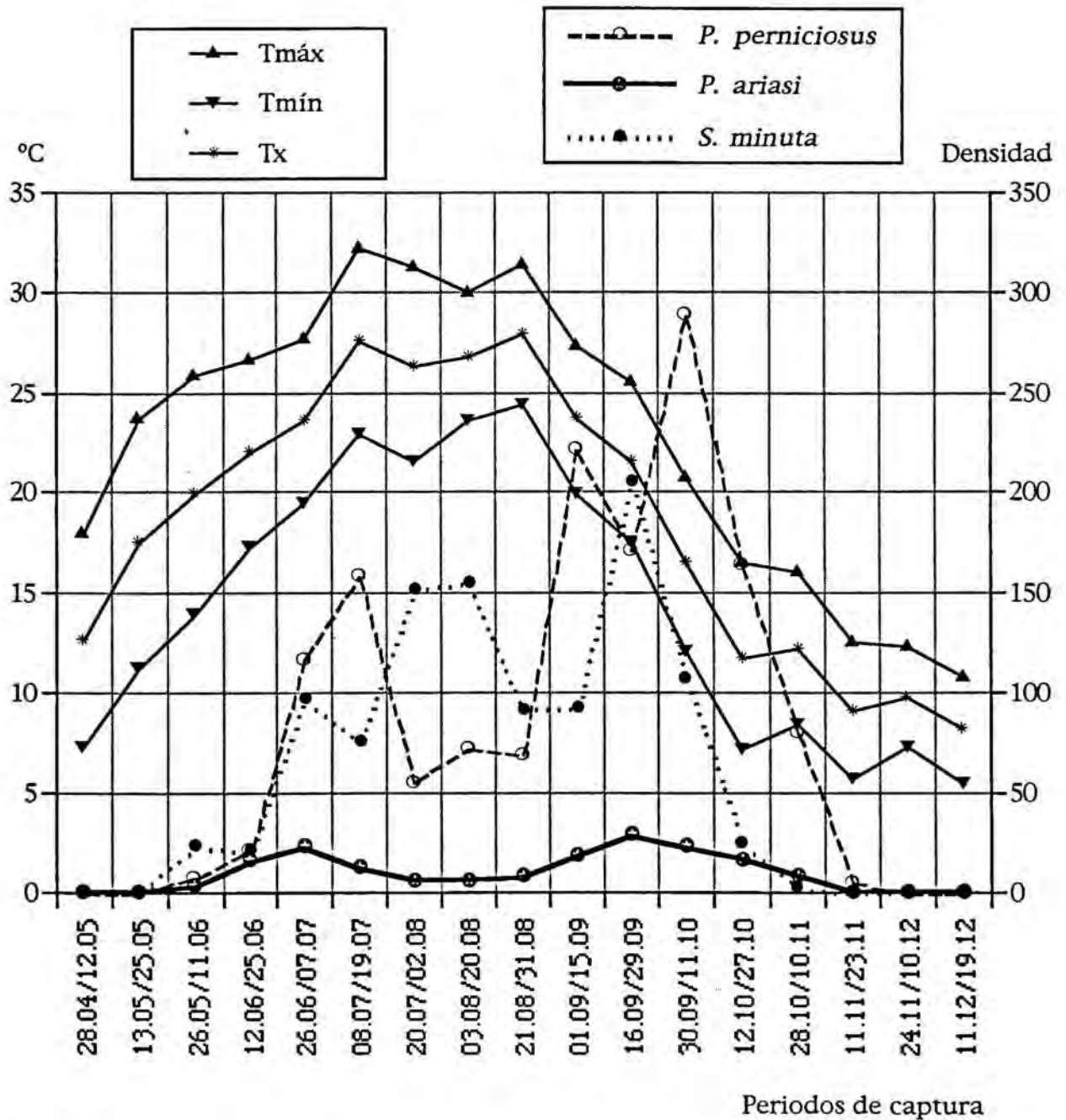


Fig. 29.- Fenología de *P. perniciosus*, *P. ariasi* y *S. minuta* en relación con la temperatura (Torroja)

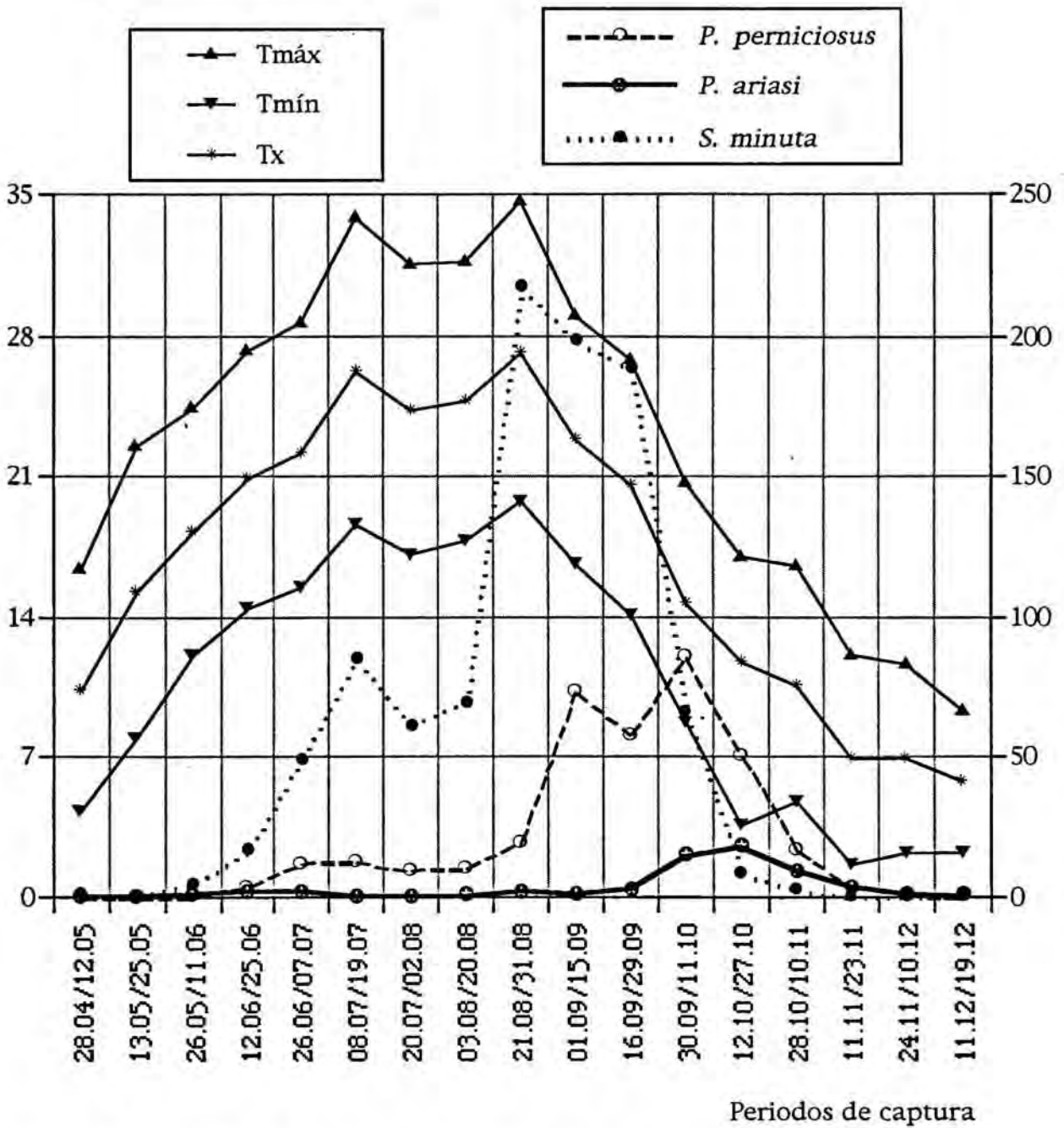


Fig. 30.- Fenología de *P. perniciosus*, *P. ariasi* y *S. minuta* en relación con la temperatura (Margalef)

Phlebotomus perniciosus

El periodo de actividad de esta especie en Torroja y Margalef ha sido de unos 7 meses, desde finales de Mayo hasta principios de Diciembre, coincidiendo en ambas localidades (Fig. 31). Sin embargo su comportamiento ha sido distinto:

En Torroja, *P. perniciosus* muestra una actividad claramente difásica, con dos picos de densidad poblacional, el primero en la primera quincena de Julio y el segundo, mayor, a principios de Octubre.

En Margalef, sólo se ha podido observar un pico de máxima densidad poblacional a principios de Octubre. Durante el primer periodo de su actividad (Junio-Agosto) el número de ejemplares capturados ha sido muy bajo debido, seguramente, a una mortalidad acusada.

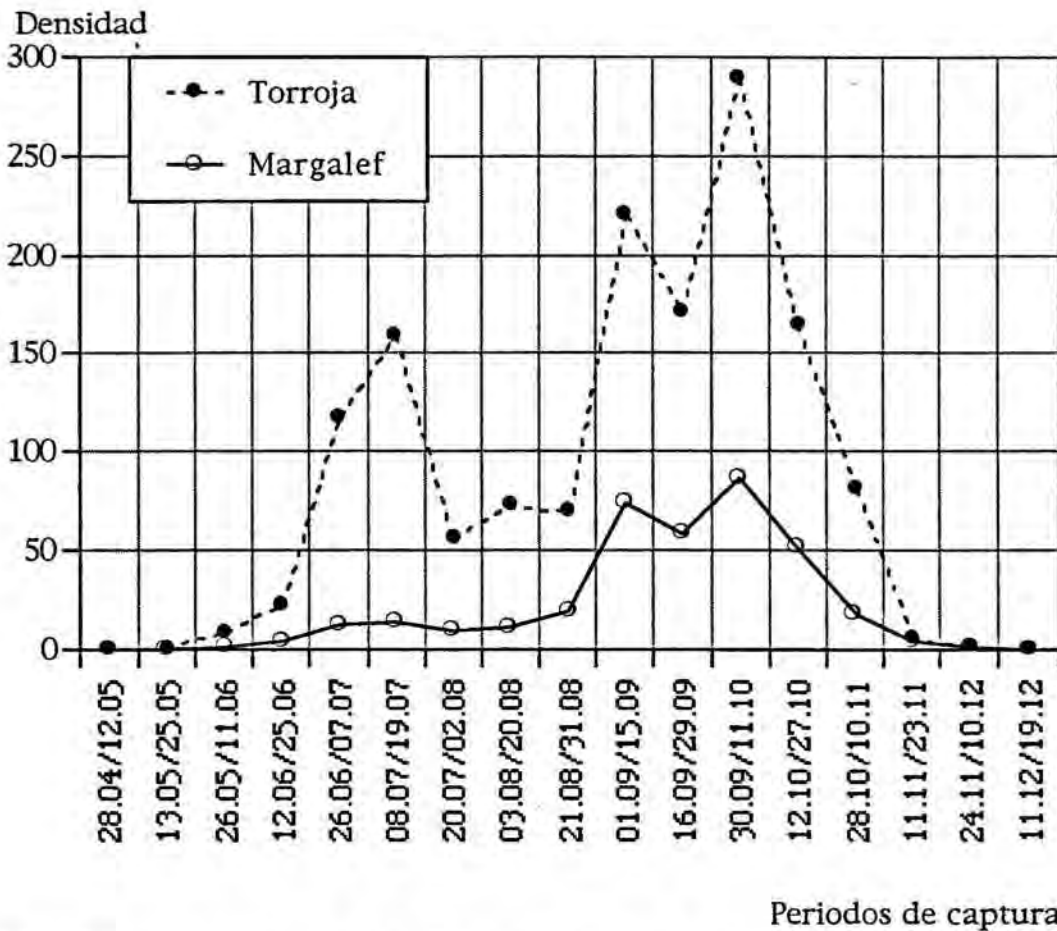


Fig. 31.- Comparación de la actividad de *P. perniciosus* en Torroja y Margalef

La actividad de *P. perniciosus* ha podido ser observada desde Marzo hasta Diciembre (126, 143).

En general, y en la Península Ibérica, su comportamiento fenológico es de tipo difásico, con dos máximos que coinciden con la primavera (principios de Junio-Julio) y el otoño (mediados de Septiembre-Octubre), estando separados por un

mínimo durante la época en que se dan las temperaturas más elevadas (30, 106, 129, 145, 147, 202). El mismo comportamiento ha presentado en Italia (26).

Sin embargo, en Francia y Portugal, donde el periodo de actividad es más corto, esta especie presenta un ciclo monofásico, con el pico de densidad en los meses de Septiembre y Agosto, respectivamente (44, 168, 179).

Phlebotomus ariasi

La actividad de *P. ariasi* ha sido más larga en Margalef que en Torroja, si bien el número de ejemplares capturados ha sido inferior (Fig. 32). En ambas localidades los adultos emergen a finales de Mayo-principios de Junio, para empezar a aumentar, de forma progresiva y rápida en Torroja, mientras que en Margalef el número de capturas se mantiene estable hasta la segunda quincena de Septiembre.

En Torroja se observan dos picos de densidad, uno a finales de Junio-principios de Julio y otro, más acusado, en la segunda quincena de Septiembre.

En Margalef, sólo se observa un pico poblacional que se sitúa en la segunda quincena de Octubre. En los meses de Junio a Agosto la población se mantiene baja, debido, seguramente y al igual que *P. perniciosus*, a una elevada mortalidad.

La actividad de esta especie ha podido ser observado durante todo el año en el sureste de la Península Ibérica (129).

En España *P. ariasi* presenta, en general, un comportamiento de tipo difásico, con dos máximos en la épocas templadas (Abril-Junio y Octubre) (106, 129, 145).

Sin embargo, en el sur de Francia (Cévennes) y en Portugal (Arrábida), el comportamiento de esta especie es de tipo monofásico, con un máximo en el mes de Agosto (161, 181). Este comportamiento también ha sido observado en la provincia de Salamanca (51) y en Cáceres (195).

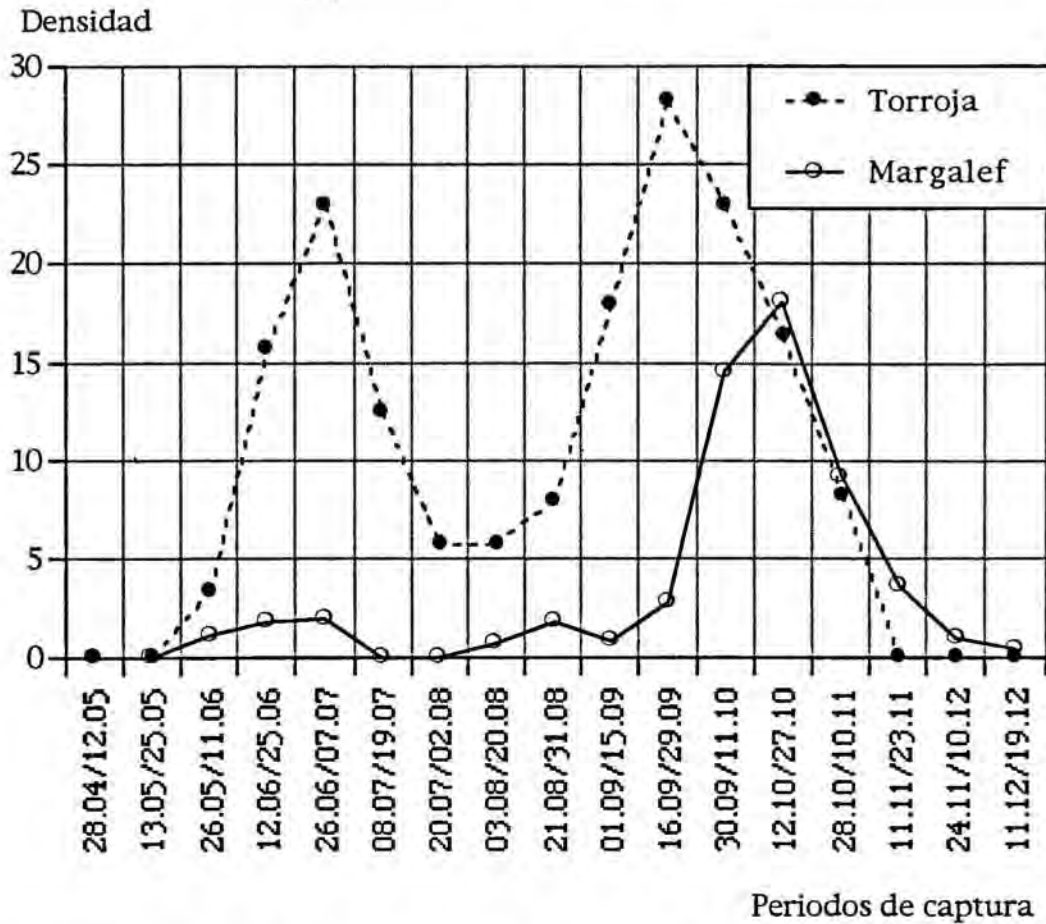


Fig. 32.- Comparación de la actividad de *P. ariasi* en Torroja y Margalef

Sergentomyia minuta

Su periodo de actividad ha sido superior en Margalef (finales de Abril hasta finales de Noviembre) que en Torroja (finales de Mayo hasta mediados de Noviembre) (Fig. 33).

En Torroja, la actividad ha sido difásica, con dos máximos, uno a mediados de Julio y otro en la segunda quincena de Septiembre.

En Margalef, la curva ha sido de tipo monofásica, con un máximo situado en la segunda quincena de Agosto.

La actividad de *S. minuta* ha podido observarse desde Abril hasta Enero en el sureste de la Península Ibérica (125).

El comportamiento fenológico de esta especie muestra que existen zonas donde pueden observarse dos generaciones estivales (30, 106, 145), otras (Menorca) donde aparecen tres generaciones (202), y por último áreas donde se observa una única generación (30, 44, 51, 195).

Martínez Ortega (125) señala que este distinto comportamiento es común en los flebotomos, presentando una generación al norte de su área de distribución y dos o más al sur.

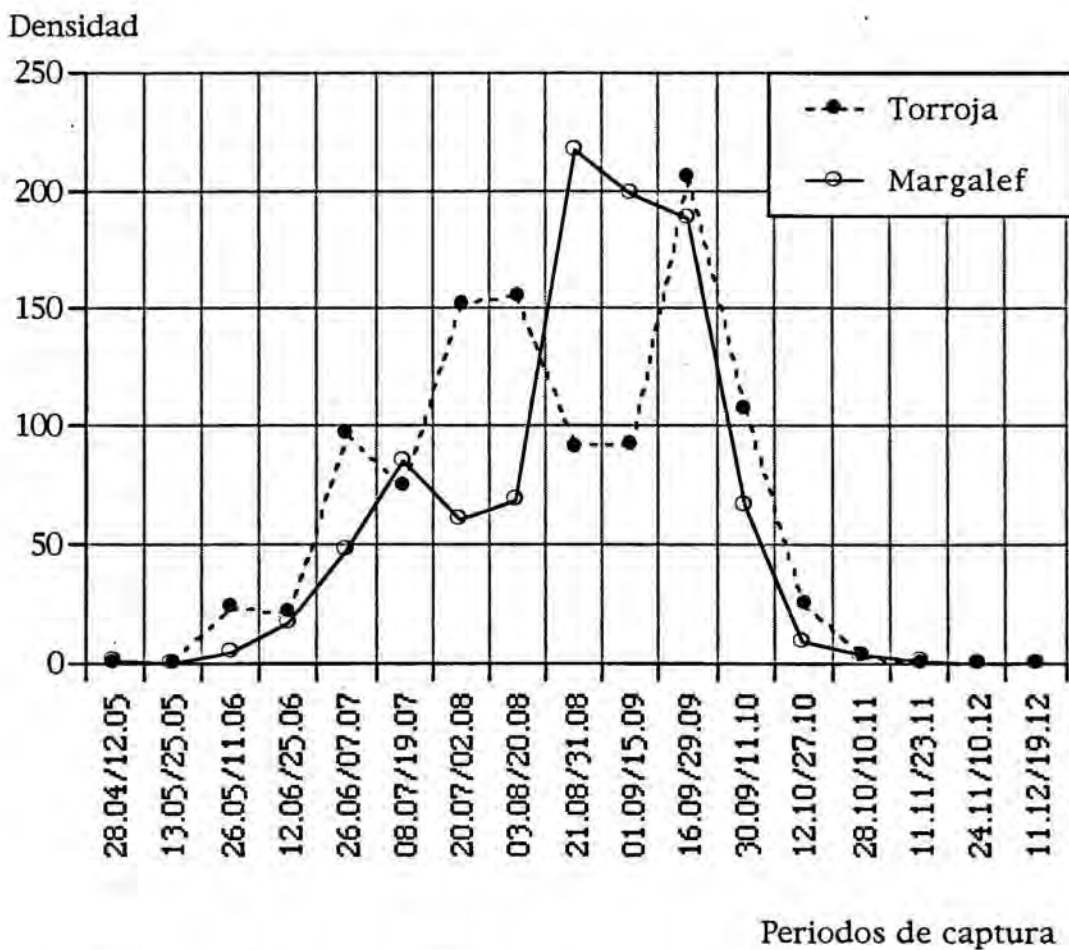


Fig. 33.- Comparación de la actividad de *S. minuta* en Torroja y Margalef

V.3.- GINANDROMORFISMO DE *PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS*

Hasta la fecha este carácter sólo había sido observada en ejemplares de: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva), *L. rorotaensis* Folch y Abonnenc, *Phlebotomus ariasi*

Tonnoir, *P. orientalis* Parrot, *Sergentomyia bedfordi* (Newstead), *S. minuta* (Rondani) y *S. minuta parroti* (Adler y Theodor), de acuerdo con la revisiones de la literatura efectuadas por Gállego y col., (63) y Martínez Ortega y col., (128) (Tabla 55).

Tabla 55.- Ginandromorfismo en flebotomos (tomado de 63 y 128)

Especie	País	Examinados	Ginandrom.	Referencia
<i>L. longipalpis</i>	Brasil	80.030	1 (0,001%)	Sherlock, 1958
<i>P. ariasi</i>	Francia	2.253	1(0,04%)	Rioux y col., 1965
<i>S. minuta</i>	Francia	165	1 (0,6%)	Rioux y col., 1974
<i>P. orientalis</i>	Etiopía	-	2	Ashford, 1974*
<i>S. bedfordi</i>	Rep. Pop. Congo	-	1	Vattier-Bernard, 1975
<i>S. m. parroti</i>	Argelia	6.087	1 (0,02%)	Addadi y Dedet, 1977
<i>S. minuta</i>	España	9.197	1 (0,01%)	Morillas Márquez y col., 1983
<i>L. rorotaensis</i>	Guinea francesa	200	1 (0,6%)	Geoffrey, 1984
<i>S. minuta</i>	España	4.028	1 (0,02%)	Lucientes Curdi, 1986
<i>S. minuta</i>	España	361	3 (0,8%)	Martínez Ortega y col., 1989**
<i>S. minuta</i>	España	1.001	31 (3,09%)	Gállego y col., 1991***
<i>S. minuta</i>	España	2.805	45 (1,6%)	Gállego y col., 1991***

* sólo los cita, no efectúa la descripción

** dos de los tres ejemplares procedían del Priorat (Pradell de la Teixeta)

*** todos los ejemplares procedían del Priorat (Pradell de la Teixeta)

Como puede observarse en la Tabla, la mayoría de los ejemplares descritos pertenecen a *S. minuta*, procedentes casi todos ellos del Priorat (Pradell de la Teixeta).

Con respecto a los ejemplares descritos de *P. perniciosus* debe señalarse que el espécimen masculino presentó el hecho, excepcional, de una rotación de 180° en su extremo abdominal, mostrando una pinza genital de aspecto normal.

V.4.- CONSIDERACIONES EPIDEMIOLÓGICAS

La simple presencia de flebotomos no es suficiente para que pueda transmitirse la LCa, estando condicionada la existencia de esta zoonosis a la densidad y al periodo de actividad de los vectores (180).

Con respecto a la densidad, Rioux y col. (176) establecen que, para *P. ariasi* en la región de las Cévennes (sur de Francia), la mayor prevalencia de la LCa se da en aquellos lugares que presentan una densidad de esta especie de 20 ejem./m²; densidades superiores no implican un aumento en la prevalencia de la enfermedad y densidades por debajo de 5 ejem./m² hacen que la transmisión sea prácticamente inexistente.

Fisa (55) obtiene resultados similares para *P. perniciosus* en la región del Priorat, encontrando una mayor prevalencia de LCa en aquellas zonas en que la densidad de esta especie es de unos 20 ejem./m², sin que tampoco se produzca un incremento al aumentar la densidad. Sin embargo, esta autora encuentra una prevalencia no despreciable de LCa (7,6%) en una zona en que la densidad de *P. perniciosus* es de unos 4 ejem./m² (Ver Tabla 10, pág. 18).

Nuestros resultados nos permiten observar que, en Torroja, donde se obtiene una densidad de *P. ariasi* de 10 ejem./m² la transmisión de *L. infantum* por esta especie es factible, si bien no se encontraría en su óptimo, mientras que en Margalef, con una densidad de 4 ejem./m², la transmisión de la enfermedad sería excepcional. Sin embargo, ya se ha indicado que la distinta densidad de esta especie en las dos localidades no es estadísticamente significativa.

Con respecto a la otra especie vectora, *P. perniciosus*, se observa que en ambas localidades se alcanzan valores de densidad superiores a los 20 ejem./m² (Torroja:

88 ejem./m² y Margalef: 21 ejem./m²). Si bien la diferencia es estadísticamente significativa, en principio no tendría que influir en la distinta distribución de la LCa, por cuanto los estudios anteriormente mencionados demuestran que a partir de una determinada densidad poblacional no se aprecia un incremento de la prevalencia de la LCa.

Al analizar el segundo punto mencionado, el periodo de actividad de estas dos especies de flebotomos, se observa que éste es prácticamente igual en las dos localidades, si bien en Torroja la densidad de ambas especies es mayor a lo largo de todos los periodos de estudio (Fig. 34).

P. perniciosus alcanza, en Torroja, los niveles de densidad óptimos para poder transmitir la enfermedad desde la segunda quincena de Junio hasta principios de Noviembre (unos 6 meses), y tan sólo al final de su periodo de actividad (finales de Noviembre) la densidad es inferior a los 5 ejem./m². En Margalef, la densidad óptima sólo se presenta desde finales de Agosto hasta finales de Octubre (dos meses); la transmisión sería excepcional hasta finales de Junio y a partir de la segunda quincena de Noviembre.

P. ariasi presenta, en la localidad de Torroja, una densidad óptima en dos periodos diferenciados. El primero, muy corto, se reduce a la quincena comprendida entre finales de Junio y principios de Julio y el segundo, algo más largo, desde la segunda quincena de Septiembre hasta la primera de Octubre (1 mes); tan sólo al inicio de su periodo de actividad, principios de Junio, la transmisión sería excepcional. En Margalef nunca se llegan a alcanzar los valores óptimos de densidad y únicamente en Octubre y principios de Noviembre se supera la densidad de 5 ejem./m².

Estas diferencias no pueden explicar, por sí solas, la distribución heterogénea de la LCa en las dos localidades. Sin embargo, un factor que podría influir, de manera notable, sería la baja supervivencia que presentan ambas especies en la localidad de Margalef en los primeros meses de su periodo de actividad, hecho que queda de manifiesto al no producirse un incremento en su densidad hasta pasados 3-4 meses de su inicio.

Los rangos de temperaturas registrados, con diferencias entre las temperaturas mínimas (que nunca superan los 20°C) y máximas más acusados que en Torroja, podrían haber influenciado la mortalidad de los flebotomos.

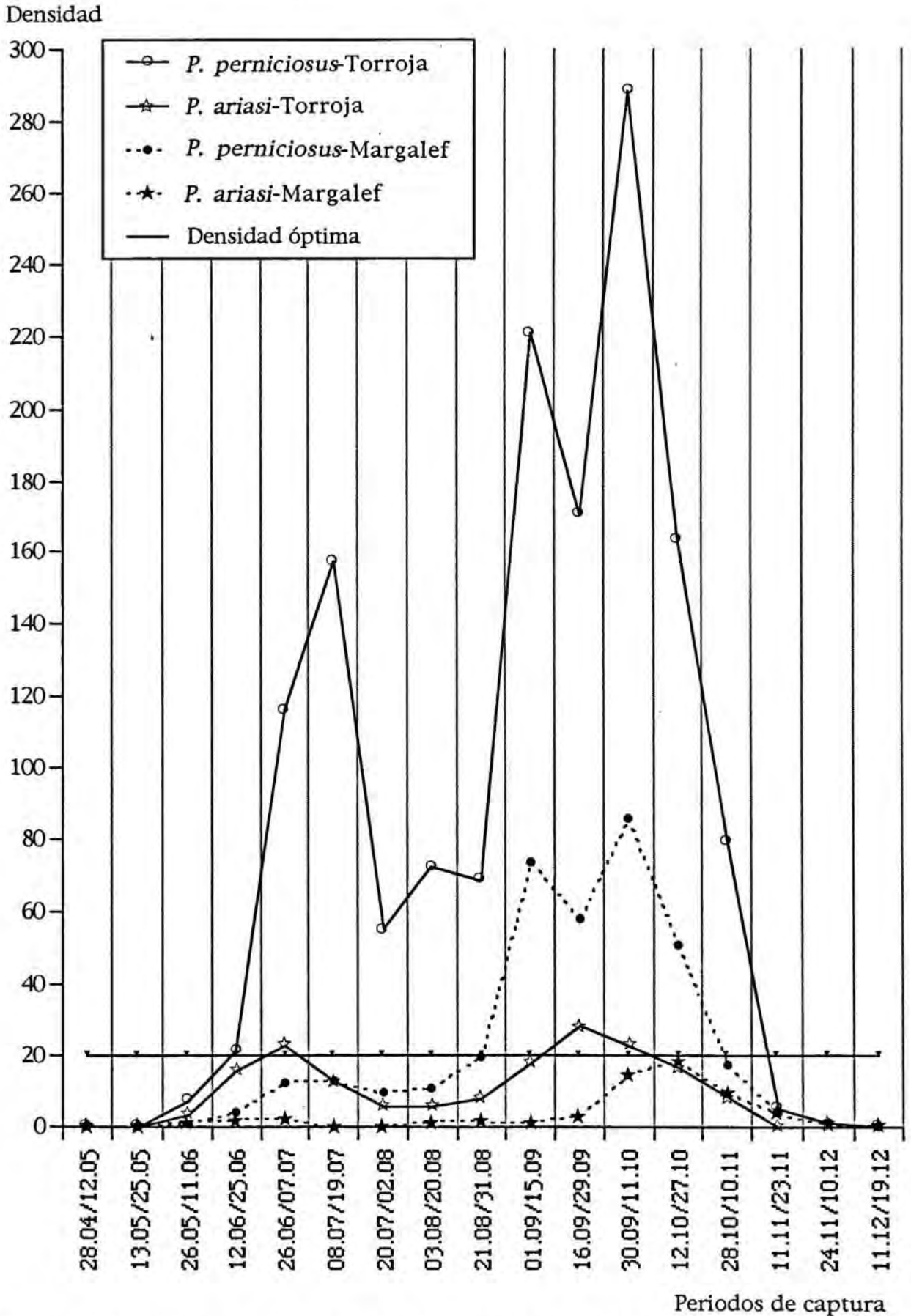


Fig. 34.- Densidad de las especies vectoras en Torroja y Margalef

Otro factor que juega un papel muy importante, tanto en la actividad del vector como en el proceso de digestión de la sangre ingerida por las hembras para alimentarse y, consecuentemente, en el desarrollo del ciclo del parásito en el vector, es la temperatura (97).

Es de sobras conocido que en los países tropicales, con temperaturas anuales altas, la actividad de los flebotomos, y de otros dípteros vectores, tiene lugar durante todo el año, mientras que en los países templados, como el nuestro, los flebotomos entran en diapausa influidos por una disminución de la temperatura y también por el fotoperíodo (171).

Rioux y col. (185) señalan que *P. ariasi*, en el sur de Francia, pierde la actividad de vuelo cuando la temperatura es inferior a los 17°C. Las condiciones óptimas se situarían alrededor de los 20°C (19-21°C).

Dergacheva (47) indica que la temperatura óptima para que los flebotomos piquen es de 25-28°C; cuando ésta es inferior a 22°C no se les observa alimentándose. Bray (37) señala temperaturas algo más bajas como idóneas para la alimentación de los flebotomos, entre 22 y 25°C.

Sin embargo, Killick-Kendrick y col. (101) señalan que *P. perfiliewi* en Italia, y a unas altitudes de 50-90 m, pica al hombre en un amplio rango de temperaturas, desde 14°C hasta 25°C.

Pocos son los trabajos publicados que tratan sobre la influencia de la temperatura en el ciclo del parásito en el vector. Entre ellos destacan los de Killick-Kendrick (97) y Rioux y col. (174).

El primero efectúa unas consideraciones generales sobre las condiciones de temperatura necesarias para que la forma metacíclica del parásito alcance la faringe y trompa, requisito indispensable para la transmisión de leishmanias a través de la picadura del vector. Esta temperatura es ligeramente distinta para distintos complejos de vector-especie parásita:

- *Lutzomyia longipalpis*-*Leishmania mexicana amazonensis*: 25°C
- *Phlebotomus argentipes*-*Leishmania donovani*: 28°C
- *Phlebotomus sergenti*-*Leishmania tropica*: 30°C

Los segundos, en un trabajo experimental de infestación de *P. ariasi* sobre un perro parasitado con *L. infantum*, a distintos rangos de temperatura (5, 10, 15, 20 y 25°C), obtienen los siguientes resultados:

- A 5°C los flebotomos restan inertes, no se realiza la digestión de la sangre y, finalmente se produce la muerte tanto del parásito como del propio flebotomo.
- A 30°C se desarrolla una infección bacteriana y/o fúngica del intestino y los flebotomos mueren.
- El aumento de la temperatura, desde 10 hasta 25°C conlleva un aumento de la proporción de flebotomos infestados y se acelera la multiplicación del parásito en el intestino medio.
- A partir de los 20°C se favorece la adhesión del parásito a las células del intestino anterior (7% a 10°C, 36,6% a 15°C, 74% a 20°C y 86% a 25°C). El aumento está ligado a la digestión del alimento.
- La fijación de promastigotes sobre la válvula esofágica, proceso considerado como precursor de la invasión faríngea, no se produce a las temperaturas de 10-15°C. A 20°C se manifiesta (en un 6% de los flebotomos), y el óptimo térmico se sitúa alrededor de los 25°C (22% de los flebotomos).

Los autores concluyen que *P. ariasi* estaría menos adaptado que *P. perniciosus* a la transmisión del parásito, ya que la primera especie se encuentra con una mayor abundancia en los pisos bioclimáticos húmedo y subhúmedo de Francia, Marruecos, Italia y Túnez, donde las temperaturas son de aproximadamente 20°C, mientras que *P. perniciosus* se encuentra más abundantemente, en la región mediterránea occidental, en zonas subhúmedas y semiáridas, con temperaturas de alrededor de 25°C.

Esta temperatura de 25°C (25-27°C) es la utilizada por Guilvard (*com. pers.*) para la cría de dos colonias de *P. perniciosus* en el laboratorio, procedente una de ellas del Priorat y la otra de Italia, y para el mantenimiento de los flebotomos tras ser infestados experimentalmente con leishmanias, bien sea artificialmente, a través de membrana, como a través de perros infestados.

Por otro lado, el cultivo de los promastigotes de leishmanias en el laboratorio se efectúa, en condiciones óptimas, a 25-26°C. Temperaturas algo inferiores retardan la multiplicación de las formas promastigotas y temperaturas superiores a 30°C inactivan al parásito.

Si consideramos que la temperatura que tiene lugar en el sitio de reposo de las hembras de flebotomos se aproxima a la temperatura media que tuvo lugar en los diferentes periodos de captura, y relacionamos la temperatura óptima (25°C , con un margen de $\pm 3^{\circ}\text{C}$) con la dinámica estacional de los vectores y su densidad se observa que:

- En la localidad de Torroja la transmisión del parásito podría tener lugar durante todo el verano, desde la segunda quincena de Junio hasta la primera quincena de Septiembre (3 meses) (Fig. 35).

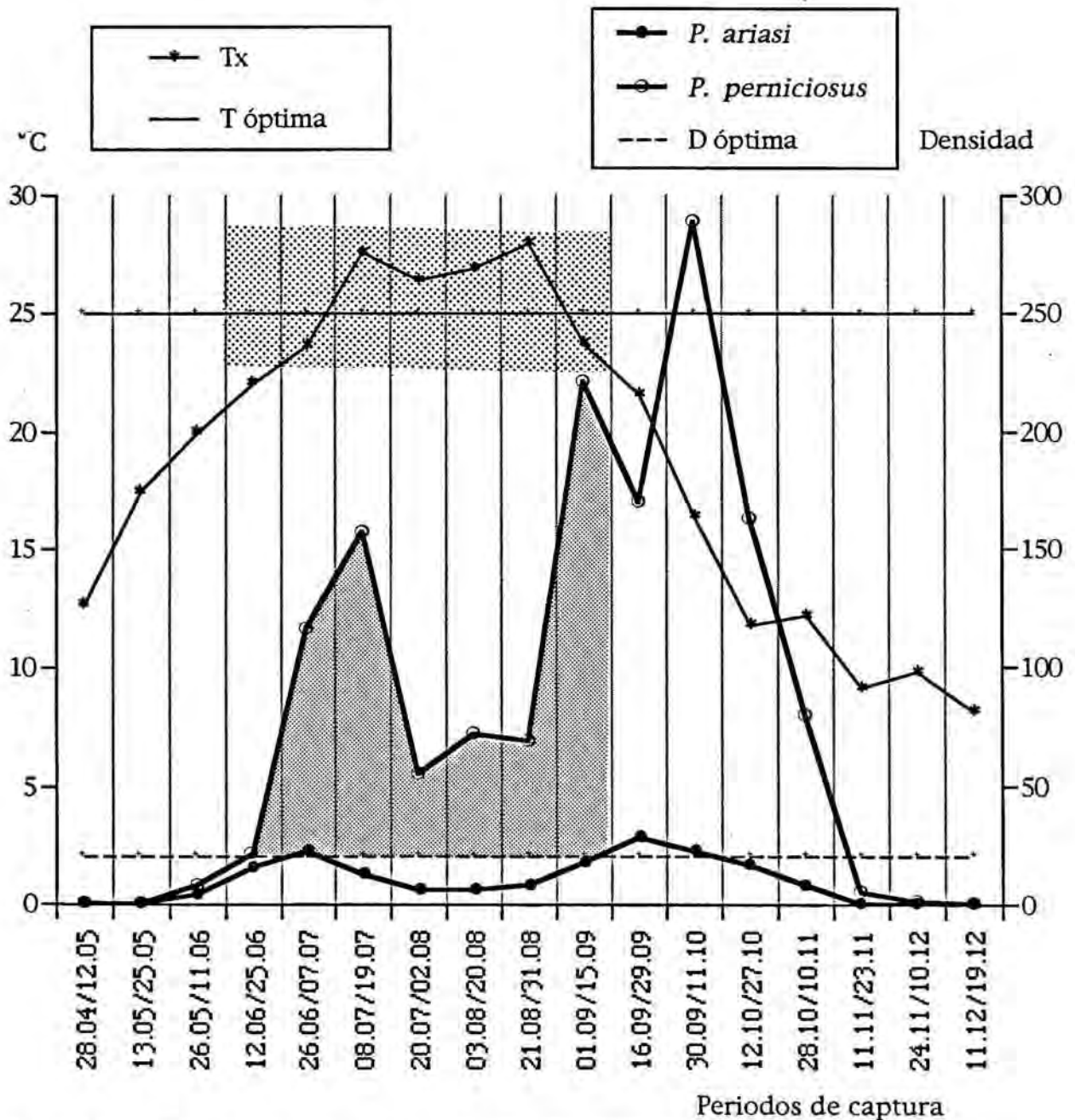


Fig. 35.- Periodo de transmisión de la leishmaniosis en Torroja

- En Margalef, sólo podría haber transmisión durante la primera quincena de Septiembre (Fig. 36), tiempo extremadamente corto para que pueda tener lugar el establecimiento y mantenimiento del parásito.

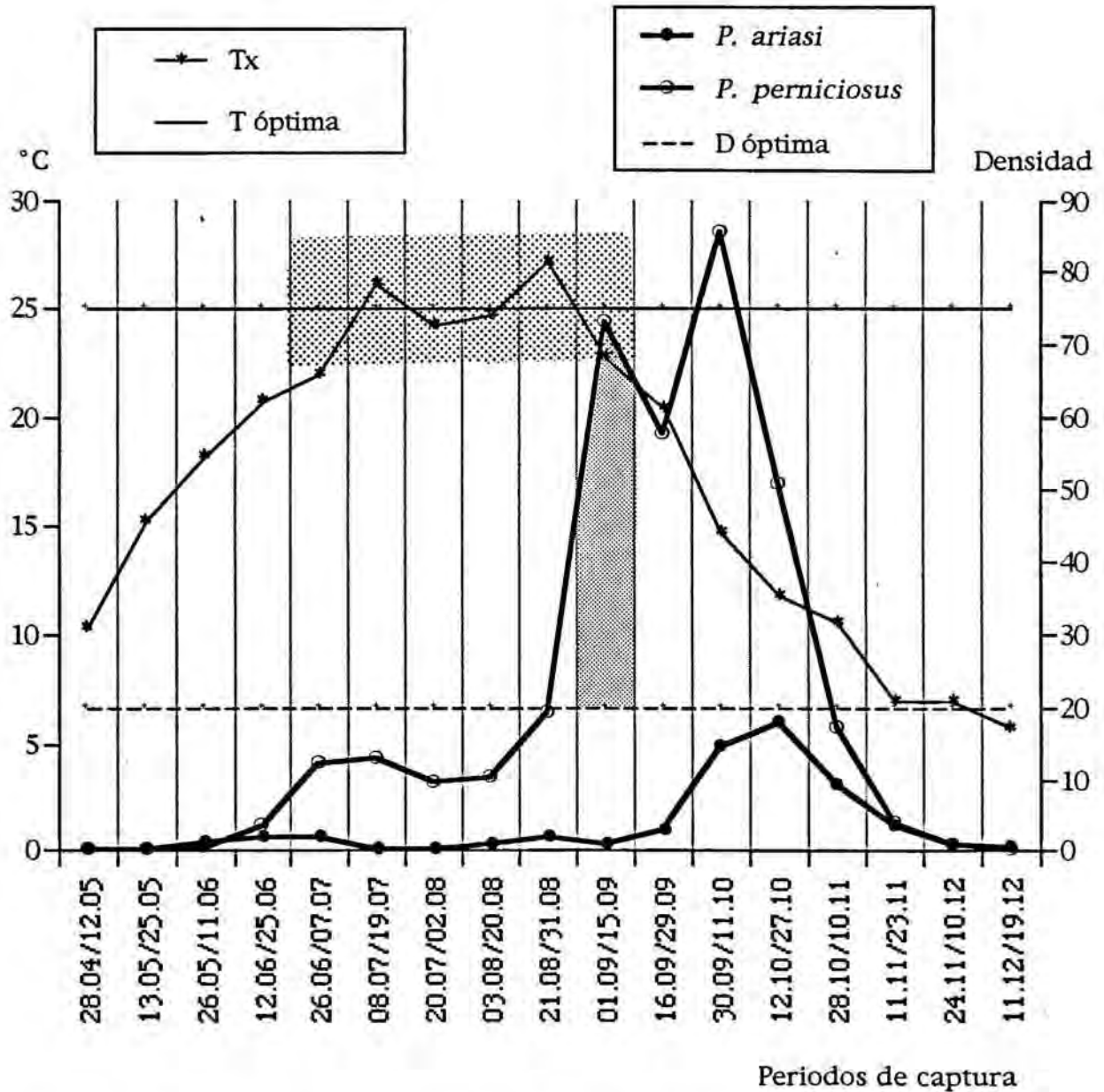


Fig. 36.- Periodos de transmisión de la leishmaniosis en Margalef

Este periodo de riesgo de transmisión y de adquisición de la LCa podría tener lugar si se considera que, en estas localidades, la población de hembras paridas, que son las que pueden transmitir el parásito, no varía a lo largo del periodo de actividad de los flebotomos tal y como observan Guilvard y col. (83) en una población de *P. perniciosus* de las Alpujarras (Granada).

Si, por el contrario, se asume la opinión de Killick-Kendrick (98) quien, y a través de los resultados obtenidos por él en colaboración con miembros del LEM, en un estudio efectuado en el sur de Francia con *P. ariasi*, indica que en el pico de densidad la mayoría de las hembras son nulíparas y que las hembras paridas están presentes cuando se produce el descenso de densidad poblacional, el periodo de transmisión quedaría reducido al mes de Agosto en la población de Torroja y sería nulo en Margalef.

Pensamos que las diferencias observadas en los dos estudios mencionados podrían ser debidas al distinto comportamiento fenológico de *P. ariasi* en el sur de Francia, de tipo monofásico, y de *P. perniciosus* en Granada, bifásico. Ello podría ser debido a la diferencia de temperaturas que se dan, en los dos lugares, durante el verano, más bajas en Francia y altas en Granada.

En nuestro caso, y al utilizar los PA como método de captura, no hemos podido efectuar el estudio de la edad fisiológica. Sin embargo, los resultados obtenidos con la variación del porcentaje de machos, en los periodos de estudio para las especies vectoras, nos inducen a pensar que, dado que el porcentaje de machos es elevado durante todos los periodos, la eclosión se produce de forma continua, por lo que la proporción de hembras paridas tendría que mantenerse a lo largo de todo el verano. Por lo tanto el periodo de transmisión sería el que hemos indicado en primer lugar.

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

A) Sobre el reservorio canino

- 1.- La seroprevalencia media de la leishmaniosis canina se ha situado en un 16% en Torroja, con una incidencia anual del 6%, y en Margalef ha sido nula, lo que corrobora resultados anteriores (Fisa, 1992) que indican la distribución heterogénea de la leishmaniosis canina en el Priorat, la cual se mantiene en el tiempo.
- 2.- Hay una escasa influencia de la sintomatología de los perros seropositivos en el éxito de los cultivos de *Leishmania infantum*.

B) Sobre los flebotomos

- 1.- La riqueza específica de los flebotomos en Torroja y Margalef es de cinco especies:
 - Phlebotomus perniciosus*
 - Phlebotomus ariasi*
 - Phlebotomus sergenti*
 - Phlebotomus papatasi*
 - Sergentomyia minuta*
- 2.- La densidad global de los flebotomos en Torroja es de 153 ejemplares por metro cuadrado y en Margalef de 74,3.
- 3.- *Phlebotomus perniciosus* es la especie más abundante en Torroja, constituyendo el 53,4% de la población. En Margalef la especie más abundante es *Sergentomyia minuta* (63,1%).
- 4.- El periodo de actividad de *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi* y *Sergentomyia minuta*, en Torroja y Margalef, es de unos seis-siete meses.
- 5.- La fenología de los flebotomos antropofílicos en Torroja sigue una curva difásica, con dos máximos de densidad poblacional. En Margalef sólo se observa un pico de máxima densidad. Sin embargo, se considera que en ambas

poblaciones emergen, como mínimo, dos generaciones de adultos a lo largo del periodo de actividad.

- 6.- Se han descrito, por primera vez, dos ejemplares ginandromorfos de *Phlebotomus perniciosus*, uno de fascies masculinoide y el otro femeninoide.

C) Sobre la epidemiología de la leishmaniosis canina

- 1.- La densidad global obtenida de las especies vectoras, *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, en Torroja y Margalef, no permite explicar la distribución heterogénea de la enfermedad.
- 2.- El periodo de actividad de los vectores es prácticamente igual en las dos localidades, no influyendo, por sí solo, en la presencia o ausencia de la enfermedad.
- 3.- En la localidad de Margalef *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* han presentado una supervivencia muy baja durante los tres-cuatro primeros meses de su periodo de actividad.
- 4.- El estudio conjunto de la actividad, la densidad y la temperatura media, en los distintos periodos de captura, ha permitido establecer el periodo de riesgo de transmisión de la leishmaniosis canina, que en Torroja se situaría a lo largo de todo el verano (desde la segunda quincena de Junio hasta la primera quincena de Septiembre) y en Margalef quedaría reducido a la primera quincena de Septiembre.
- 5.- Las diferencias detectadas, tanto en la supervivencia de los vectores como en el periodo de riesgo de transmisión de la leishmaniosis canina, podrían explicar la ausencia de la enfermedad en Margalef.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

A

- 1.- Abranches, P. (1989).- Reservoirs of visceral leishmaniasis. *In: Leishmaniasis. The Current Status and New Strategies for Control*. Hart D. T. Edit., NATO ASI Series A: Life Sciences, Vol. 163: 61-70.
- 2.- Abranches, P.; Conceição-Silva, F.M.; Silva-Pereira, M.C. (1984).- Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrábida. *J Trop. Med. Hyg*, 87: 197-200.
- 3.- Abranches, P.; Conceição-Silva, F.M.; Silva-Pereira, M.C.D. (1986).- La leishmaniose viscérale dans la région de Lisbonne. Identification enzymatique. Interprétation structurale du foyer. *In: Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. IMEEE, Montpellier: 427-432.
- 4.- Abranches, P.; Lopes, F.J.; Silva, F.M.C.; Ribeiro, M.M.S.; Pires, C.A. (1983).- Le Kala-azar au Portugal. III. Résultats d'une enquête sur la leishmaniose canine dans les environs de Lisbonne. Comparaison des zones urbaines et rurales. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, 58: 307-315.
- 5.- 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.; Janz, J.G. (1992).- Kala-azar in Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijo (endemic region of Alto-Douro). *Research and Reviews in Parasitology*, 52: 121-124.
- 6.- Abranches, P.; Silva-Pereira, M.C.D.; Conceição-Silva, F.M.; Santos-Gomes, G.M.; Janz, J.G. (1991).- Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.*, 77: 557-561.
- 7.- Acedo Sanchez, C.; Martín Sanchez, I.; Morillas Márquez, F.; Mustafa Louassini; Sanchís Marin, M.C.; Velez Bernal, I.D.; Gonzalez Castro, J. (1992).- Determinación de la seroprevalencia y del agente etiológico de la leishmaniosis canina en la comarca de las Alpujarras (Granada). Resúmenes de la IX Reunión Científica de la Asociación de Parasitólogos Españoles, León: 16.
- 8.- Acedo Sanchez, C.; Morillas Márquez, F.; Martín Sanchez, J.; Sanchís Marin, M.C. (1991).- Leishmaniosis canina en el medio urbano del sur de España. Resúmenes del ICASEP I, Valencia: 309.
- 9.- Adler, D.S. (1964).- *Leishmania*. *Adv. Parasitol.*, 2: 35-96.
- 10.- Adler, S. y Theodor, O. (1932).- Investigations on mediterranean Kala-azar. VI. Canine visceral leishmaniasis. *Proceedings of the Royal society, Series B, Biological Sciences* (London) 110: 402-412.
- 11.- Aisa Nache, M^a J. (1991).- **Presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en carnívoros salvajes**. Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 93 pp.
- 12.- Aisa, M^a J.; de Colmenares, M.; Castillejo, S.; Fisa, R.; Gállego, M.; Riera, C.; Torras, S.; Valls, A.; Portús, M. (1983).- El diagnóstico de la leishmaniosis canina por la técnica de "Western- Blot". Resúmenes del III Congreso Ibérico de Parasitología/VIII Congreso Nacional de Parasitología, Lisboa: 296.

- 13.- Aisa, M^a J.; Riera, C.; Fisa, R.; Miquel, M.; Portús, M. Gállego, M. (1991).- El zorro como posible reservorio de *Leishmania* en el noroeste Ibérico. Resúmenes del ICASEP I, Valencia: 363.
- 14.- Allain, D.S. (1964).- Evaluation of the viability and Pathogenicity of hemoflagellates after freezing and storage. *J. Parasitol.*, 50: 604-607.
- 15.- Alvar, J. (1994).- Leishmaniasis and AIDS Co-infection: The Spanish Example. *Parasitology Today*, 10: 160-163.
- 16.- Alvar, J.; Alfonso Ballesteros, J.; Soler, R.; Benito, A.; van Eys, G.J.J.M.; Schoone, G.J.; Cabrer, B. (1990).- Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: Biochemical characterization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43: 614-618.
- 17.- Alvar, J.; Gutierrez-Solar, B.; Aguilar, A.; Castillo, J.A.; Lucientes, J. (1990).- Análisis del DNA de *L. infantum*. Caracterización de aislados de diferentes mamíferos. Resúmenes del Congreso de Zoonosis, 1er Interautonómico Español, Valencia: 231-232.
- 18.- Alvar, J.; Jiménez, M.I. (1994).- Could infected drug abusers act as potencial *L. (L.) infantum* reservoirs?. *Aids*, 8: 854.
- 19.- Alvar, J.; Ortiz, M. (1987).- Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en la provincia de Madrid. *Rev. Ibér. Parasitol.*, Vol. Extra.: 45-50.
- 20.- Angelici, M.C.; Gramiccia, M.; 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.
- 21.- Arnedo, A.; Arias, A.; Gonzalez, F.; Calvo, C.; Sajont, L.; Pons, P.; Bellido, J. (1990).- Leishmaniosis. Estudio serológico en la población canina de Castellón ciudad. Resúmenes del Congreso de Zoonosis, 1er Interautonómico Español, Valencia: 180.
- 22.- Ashford, R.W.; Desjeux, P.; de Raadt, P. (1992).- Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, 8: 104-105.

B

- 23.- Benito, A.; Alvar, J. (1989).- Estudio preliminar de la leishmaniosis en la comunidad de Castilla-La Mancha. Resúmenes del I Congreso Ibérico de Parasitología/VI Congreso Nacional de Parasitología, Cáceres: 194.
- 24.- Bettini, S.; Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Atzeni, M.C. (1986).- Leishmaniasis in Sardinia. II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in the province of Cagliari. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80: 458-459.
- 25.- Bettini, S.; Pozio, E.; Gradoni, L. (1980).- Leishmaniasis in Tuscany (Italy). II. *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 77-83.
- 26.- Biocca, E.; Coluzzi, A.; Constantini, R. (1977).- Distribution des différentes espèces de phlébotomes en Italie et transmission des leishmanioses et quelques arboviroses. In: *Écologie des Leishmanioses*. Coll. Int. du C.N.R.S. N° 239: 157-166.
- 27.- Bolos, O., de; Vigo, J. (1984).- Flora dels Països Catalans. Vol I (Introducció. Licopodiàcies-Capparàcies). Edit. Barcino, 740 pp.

- 28.- Botet Fregola, J. (1985).- **La leishmaniasis a l'Espanya Peninsular. Recull històric.** Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 229 pp.
- 29.- Botet Fregola, J. (1991).- **Los Phlebotomidae (Insecta, Diptera) de Barcelona en tanto que vectores de *Leishmania*. Ross, 1903. Contribución a su conocimiento.** Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 310 pp.
- 30.- Botet, J.; Gállego, M.; Portús, M. (1989).- Estudio preliminar sobre la distribución y fenología de los flebotomos en Barcelona. Resúmenes del I Congreso Ibérico de Parasitología/VI Congreso Nacional de Parasitología, Cáceres: 200.
- 31.- Botet Fregola, J.; Portús Vinyeta, M. (1993).- La leishmaniosis en la España Peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). *Rev. San. Hig. Pub.*, 67: 255-266.
- 32.- Botet, J.; Seguí, M.G.; Gállego, M.; Portús, M. (1991).- Sesgos derivados del método de captura en estudios sobre flebotómidos (Diptera, Psychodidae). Resúmenes del ICASEP I, Valencia: 366.
- 33.- Botet, J.; Serra, T.; Portús, M.; Mora, R.; Gállego, M. (1987).- Incidencia de la leishmaniosis en el área de Barcelona. *Rev. Ibér. Parasitol.*, Vol. Extra: 51-54.
- 34.- 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: 57-72.
- 35.- Brandonisio, O.; Altamura, M.; Carelli, G.; Ceci, L.; Antonaci, S.; y Jirillo, E. (1989).- Lymphocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *EOS*, 9 :37-40.
- 36.- Brandonisio, O.; Carelli, E.; Ceci, L.; Consenti, B.; Fasanella, A.; Puccini, V. (1992).- Canine leishmaniasis in the Gargano Promontory (Apulia, South Italy). *European Journal of Epidemiology*, 8: 273-276.
- 37.- Bray, R. (1982).- The zoonotic potential of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. *Ecol. Dis.*, 1: 257-267.
- 38.- Brazal, T.; Ruiz Atienza, L.; Fernández Garcia, M.I. (1990).- Estudio de la leishmaniosis visceral canina en la comarca de Alicante por medio de la Inmunofluorescencia Indirecta. *Ciencias Veterinarias*, 4: 77-80.

C

- 39.- Cabral, M.; O'Grady, J.; Alexander, J. (1992).- Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology*, 14: 531-539
- 40.- Castillo Hernandez, J.A.; Sanchez Acedo, C.; Gutierrez Galindo, J.; Lucientes Curdi, J.; Estrada Peña, A.; Galmes Femenias, M. (1985).- Estudio epidemiológico de la leishmaniosis canina en la provincia de Zaragoza. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Parasitología, Tenerife: 31.
- 41.- Colmenares, M., de; Portús, M.; Botet, J.; Dobaño, C.; Gállego, M.; Wolff, M.; Seguí, G. (1995).- Identification of Blood Meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Biotin/Avidin Method. *J. Med. Entomol.*, 32: 229-233.

- 42.- Conesa Gallego, E. (1994).- **Los flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Comunidad de Madrid. Implicaciones epidemiológicas.** Tesis Doctoral. Facultad de Biología Animal, Universidad de Murcia, 381 pp.
- 43.- Corachán, M.; Portús, M.; Filella, E.; Ollé, J.E. (1987).- La leishmaniosis en Cataluña. Estudio preliminar. *Rev. San. Hig. Púb.*, 61: 1229-1236.
- 44.- Croset, H.(1969).- **Écologie et Systématique des Phlebotomini (Diptera, Psychodidae) dans des foyers, Français et Tunisien, de leishmaniose viscérale. Essai d'interpretation épidémiologique.** Thèse de Sciences, Université de Montpellier, 516 pp.
- 45.- Croset, H.; Rioux, J.A.; Juminer, B.; Tour, S. (1970).- Fluctuations anuales des populations de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, *Phlebotomus perfiliewi* Parrot, 1930 et *Sergentomyia minuta* Parroti (Adler et Theodor, 1927) (Diptera, Psychodidae) en Tunisie du nord. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 45:177-184.

D

- 46.- Dereure, J. (1993).- **Place du chien dans les complexes pathogènes leishmaniens des pays du parteur méditerranéen et du Moyen-Orient (Algérie, Egypte, France, Maroc, Syrie, Yémen).** Thèse Doctoral, Faculté de Médecine, Université de Montpellier I, 179 pp.
- 47.- Dergacheva, T.I. (1967).- Ecology of sandflies in a natural focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis. **W.H.O. Inter-Regional Travelling Seminar on Leishmaniasis.** Moscow, U.S.S.R. (En Lucientes, 207).
- 48.- Desjeux, P. (1992).- Human Leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *Wld. hlth. statist. quart.*, 45: 267-275.
- 49.- 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 : 1005-1009.
- 50.- Dye, C.; Vidor, E.; Dereure, J. (1993).- Serological diagnosis of leishmaniasis on detecting infection as well as disease. *Epidemiology and Infection*, 103: 647-656.

E

- 51.- Encinas Grandes, A.; Gomez Bautista, M.; Martin Novo, M.; Simon Martin, F. (1988).- Leishmaniasis in the province of Salamanca, Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 63: 387-397.
- 52.- Evans, D. A. (1987).- *Leishmania. In: In vitro Methods for Parasite cultivation.* A.E.R., Taylor y J.R., Baker Edit., Academic Press: 52-75.
- 53.- Evans, T.G.; Smith, D.; Person, R.D. (1990).- Humoral factors and nonspecific immune suppression in syrian hamsters with *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.*, 76 : 212-217.

F

- 54.- Ferrer, L.; Aisa, M.J.; Roura, X.; Portús, M. (1995).- Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniosis. *The Veterinary Record*, 136: 514-516.
- 55.- Fisa Saladrigas, R. (1992).- **Estudios sobre la estructura y dinámica del foco de leishmaniosis del Priorat**. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 289 pp.
- 56.- Fisa, R.; Gállego, M.; Portús, M.; Gállego, J. (1990).- Evolución de la leishmaniosis canina en zona endémica, a través de su seguimiento serológico. Resúmenes del **Congreso de Zoonosis, 1er Interautonómico Español**, Valencia: 179.
- 57.- Fisa, R.; Gállego, M.; Portús, M.; Gállego, J. (1991).- Evolución de la leishmaniosis canina a través de su seguimiento serológico. *Ciencias Veterinarias*, 4: 69-76.
- 58.- Fisa, R.; Gállego, M.; Portús, M.; Mora, R. (1987).- La técnica "Dot-ELISA"-Proteína A-Peroxidasa y su utilización en el estudio seroepidemiológico de los reservorios de *Leishmania*. Resúmenes del **V Congreso Nacional de Parasitología**, Salamanca: 297-298.
- 59.- Fisa, R.; Portús, M.; Gállego, M.; Valls, D.; Aisa, M^aJ. (1992).- El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina en la comarca del Priorat (Tarragona). *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 12: 231-236.
- 60.- Folch i Guillen, R. (1986).- **La Vegetació dels Països Catalans**. Edit. Ketres S.A., 541 pp.

G

- 61.- Gállego Berenguer, J.; Botet Fregola, J.; Gállego Culleré, M.; Portús Vinyeta, M. (1992).- Los flebotomos de la España Peninsular e islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. *In: "In memoriam" al Profesor Doctor D. F. de P. Martínez Gómez*. S. Hernández Rodríguez Editor. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba: 581-600.
- 62.- Gállego, J.; Gállego, M.; Castillejo, S.; Fisa, R.; Portús, M. (1994).- First cases of gynandromorphism in *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Parasite*, 1: 87-88.
- 63.- Gállego, J.; Gállego, M.; Fisa, R.; Portús, M. (1991).- Gynandromorphism in sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with reference to thirty-one new cases in an isolated *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) population. *Research and Reviews in Parasitology*, 51: 51-56.
- 64.- Gállego, M.; Fisa, R.; Rioux, J.A.; Pratlong, F.; Guilvard, E.; Gállego, J.; Riera, C.; Juncosa, T.; Portús, M. (1993).- Los zimodemas de *Leishmania infantum* en la comarca del Priorato. *Acta Paras. Port.*, 1: 49.
- 65.- Gállego, M.; Gállego, J.; Marrugat, O.; Fisa, R.; Portús, M.; Riera, C. (1991).- Gynandromorphism in a population of *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) in the Northeast of Spain. *Parassitologia*, 33: 253-260.

- 66.- Gállego, M.; Pratlong, F.; Riera, C.; Torras, S.; Fisa, R.; Martini, A.; Muñoz, C.; Serra, T.; de Colmenares, M.; Aisa, M.J.; Portús, M.; GCEL (1994).- Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from man in the NE of Spain. Resúmenes del ICOPA VIII, Izmir (Turquía), Vol. 2: 343.
- 67.- Gállego, M.; Rioux, J.A.; Rispail, P.; Guilvard, E.; Gállego, J.; Portús, M.; Delalbre, A.; Bastien, P.; Martínez-Ortega, E.; Fisa, R. (1990).- Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Rev. Ibér. Parasitol.*, 50: 123-127.
- 68.- Garnham, P.C.L. (1965).- The *Leishmania* with special reference to the role of animal reservoir. *Am. Zool.*, 5: 141-151.
- 69.- 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., 270 pp.
- 70.- Gil Collado, J.; Morillas Márquez, F.; Sanchís Marin, M.C. (1989).- Los flebotomos en España. *Rev. San. Hig. Púb.*, 63: 15-34.
- 71.- Gonzalez Castro, J.; Morillas Márquez, F.; 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 Grenade. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 62: 101.
- 72.- Goyena, M.; Conesa Gallego, E.; Romera, H.; Martínez-Ortega, E. (1991).- Estudio biométrico de las poblaciones de *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) del sureste de la Península Ibérica. *Parassitologia*, 33: 273-281.
- 73.- Gradoni, L.; Gramiccia, M.; Mancianti, F.; Pieri, S. (1988).- Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82: 568-571.
- 74.- Gradoni, M.; Maroli, M.; Gramiccia, M.; Mancianti, M. (1987).- *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medical and Veterinary Entomology*, 1: 339-342.
- 75.- Gradoni, L.; Pozio, E.; Bettini, S.; Gramiccia, M. (1980).- Leishmaniasis in Tuscany (Italy). III. The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto province. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 421-422.
- 76.- Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Pozio, E. (1986).- Caractérisation biochimique de souches du complexe *Leishmania infantum* isolées en Italie. In: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques.* IMEEE, Montpellier: 445-454.
- 77.- Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Troiani, M. (1992).- HIV-*Leishmania* coinfections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86: 161-163.
- 78.- Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Troiani, M. (1995).- Heterogeneity among zymodemes of *Leishmania infantum* from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. *FEMS Microbiology Letters*, 128: 33-38.
- 79.- Gramiccia, M.; Maazoun, R.; Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Le Blancq, S.; Evans, D.A.; Peters, W.; Bettini, S.; Gradoni, L.; Pozio, E. (1982).- Typage enzymatique de onze souches de *Leishmania* isolées en Italie continentale à partir des formes viscérales murines canines et vulpines. Mise en évidence d'une variant enzymatique chez le Renard (*Vulpes vulpes*). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 57: 527-531.
- 80.- Gran Enciclopèdia Catalana (1978).- Vol. 12. Editorial Enciclopèdia Catalana S.A.: 83-85.

- 81.- Groulade, P. y Bourdeau, P. (1988).- Moyens pratiques de mise en évidence des leishmanies. *Pratiqu. médic. et chirurgic. de l'Anim. de Cie.*, 23 :73-79.
- 82.- Guillen, J.L.; Calvo, M.J.; Olmeda, A.S.; Valcarcel, F. (1992).- Seroprevalencia de la leishmaniosis en la Comunidad de Madrid. Resúmenes de la IX Reunión Científica de la Asociación de Parasitólogos Españoles, León: 17.
- 83.- Guilvard, E.; Wolff, M.; Morillas, F.; Martín, J.; Velez, I.D. (1995).- *Phlebotomus perniciosus* as a vector of *Leishmania infantum* in the south of Spain (Province of Granada): rate of infestation and physiological age of the population. Resúmenes del II ISOPS, Mérida (Venezuela): 46.
- 84.- Guimaraes, M.C.S.; Castilho, E.A.; Celeste, B.J.; Nakahara, O.S.; Amatoweto, 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: 16-28.
- 85.- Gustafson, T.L.; Reed, C.N.; McGreevy, P.B.; Pappas, M.G.; Fox, J.C.; Lawyer, P.G. (1985).- Human Cutaneous Leishmaniasis Acquired in Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34: 58-63.
- 86.- Guy, M.W.; Killick-Kendrick, R.; Gill, G.S.; Rioux, J.A.; Bray, R.S. (1984).- Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1927 in the Cévennes by bloodmeal analyses. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 59: 449-458.

H

- 87.- Hasibeder, G.; Dye, C.; Carpenter, J. (1992).- Mathematical modelling and theory for estimating the basic reproduction number of canine Leishmaniasis. *Parasitology*, 105: 43-53.
- 88.- Hawkes, R.; Niday, E.; Gordon, J. (1982).- A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.*, 119: 142-147.
- 89.- Ho, M.; Leeuwenburg, J.; Mbugua, G.; Wamachi, A.; Voller, A. (1984).- An enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 943-946.
- 90.- Houin, R.; Jolivet, G.; Combescot, C.; Deniau, M.; Puel, F.; Barbier, D.; Romano, P.; Kerboenz, D. (1977).- Étude préliminaire d'un foyer de leishmaniose canine dans la région de Tours. *In: Écologie des Leishmanioses. Coll. Int. du C.N.R.S., N° 239: 109-115.*

I

- 91.- Iglesias, J. (1974).- Geografía de Cataluña III. Geografía comarcal - 2. VI Priorat Edit. AEDOS: 141-170.
- 92.- Izri, M. A.; Marty, P.; Rahal, A.; Lelievre, A.; Ozon, C.; Baldelli, G.; Presiozo, J.; Haas, P.; Le Fichoux, Y. (1992).- *Phlebotomus perniciosus* naturellement infesté par des promastigotes dans le région de Nice, France. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 85: 385-387.

J

- 93.- Jahn, A.; 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. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 451-454.
- 94.- Jiménez, M.I.; Gutierrez-Solar, B.; Benito, A.; Aguilar, A.; Garcia, E.; Cercenado, E.; Alvar, J. (1991).- Cutaneous *Leishmania (L.) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Research and Reviews in Parasitology*, 51: 95-99.
- 95.- Jiménez, M.I.; Laguna, P.; de la Torr , F.; Sol s, F.; Pratlong, F.; Alvar, J. (1995).- New *Leishmania (Leishmania) infantum* responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 89:33.

K

- 96.- Kagan, I. G. (1972).- Evaluation of the indirect hemagglutination test as an epidemiologic technique for malaria. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 21: 683-689.
- 97.- Killick-Kendrick, R. (1979).- Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 2. Ed. W.H.R. Lumsden & D.A. Evans. Academic Press, London/New York: 395-460.
- 98.- Killick-Kendrick, R. (1983).- Investigation of phlebotomine sandflies vectors of leishmaniasis. *Proceedings of the Indo-Uk Workshop on leishmaniasis*, Patna (India): 72-83.
- 99.- Killick-Kendrick, R. (1987).- Studies and criteria for the incrimination of vectors and reservoir host of the leishmaniasis. *Proceedings of The International Workshop of Research and control strategies for the leishmaniasis*, Ottawa: 272-280.
- 100.- Killick-Kendrick, R.; Killick-Kendrick, M.; Pinelli, E.; Del Real, G.; Molina, R.; Vitutia, M.M.M.; Ca avate, M.C.; Nieto, J. (1994).- A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotome sandflies. *Parasite*, 1: 311-318.
- 101.- Killick-Kendrick, R.; Ready, P.D.; Pampiglione, S. (1977).- Notes on the prevalence and host preferences of *Phlebotomus perfiliewi* in Emilia-Romagna, Italy. In: * cologie des leishmanioses*. Coll. Int. du C.N.R.S., N  239: 169-175.

L

- 102.- Lanotte, G. (1975).- *Le Foyer de Leishmaniose viscérale des Cévennes. Limites et structures. Essai méthodologique*. Thèse Doctoral, Faculté de Médecine, Université de Montpellier, 269 pp.
- 103.- Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Croset, H.; Vollhardt, Y. (1978).-  cologie des leishmanioses dans le sud de la France. 9. Les méthodes d'échantillonnage dans le dépistage et l'analyse de l'enzoote canine. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 53: 33-35.

- 104.- Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Maazoun, R.; Pasteur, N.; Pratlong, F.; Lepar, J.A. (1981).- Application de la méthode numérique à la taxonomie du 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.
- 105.- Lanotte, G.; Rioux, J.A.; Périères, J.; Vollhardt, Y. (1979).- Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bioclinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 54: 277-295.
- 106.- Lucientes Curdi, J. (1986).- **Contribución al conocimiento de la leishmaniosis visceral canina en Zaragoza. Estudio biológico y ecológico de las poblaciones de los flebotomos vectores.** Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 449 pp.
- 107.- Lucientes-Curdi, J.; Sánchez-Acedo, C.; Castillo-Hernandez, J.A.; 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: 7-8.

LL

- 108.- Lladó Villalonga, T.; Rotger Sureda, M.J. (1990).- **Estudio del flebotomo como vector de la leishmaniasis en la isla de Mallorca.** Edit.: Conselleria de Sanitat i Seguritat Social del Govern Balear, Palma de Mallorca, 109 pp.
- 109.- Lluch Borrás, C.; Soriano Mestre, J (1990).- Relación entre la aparición de signos clínicos y el diagnóstico de la Leishmaniosis. *Ciencias Veterinarias*, 4: 87-92.

M

- 110.- Maazoun, R.; Lanotte, G.; Pasteur, N.; Rioux, J.A.; Kennou, M.F.; Pratlong, F. (1981).- Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 16. Contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscéral méditerranéenne. A propos de 55 souches isolées en Cévennes, Côte d'Azur, Corse et Tunisie. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 56: 131-146.
- 111.- Mancianti, F.; Gradoni, L.; Gramiccia, M.; Pieri, S.; Marconcini, A. (1986).- Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trop. Med. Parasit.*, 37: 110-112.
- 112.- Mancianti, F.; Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Pieri, S. (1988).- Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82: 566-567.
- 113.- Mancianti, F.; Mignone, W.; Galastri, F. (1994).- Serological survey for leishmaniasis in Free-living Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *J. Wildl. Dis.*, 30: 454-456.
- 114.- Mansueto, S.; di Leo, R.; Miceli, M.D.; Quartararo, P. (1982).- Canine leishmaniasis in three foci in western Sicily. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76: 565.

- 115.- Marin Iniesta, F.; Marin Iniesta, E.; Martin Luengo, F. (1982).- Papel de perros y zorros como reservorios de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 42: 307-313.
- 116.- Maroli, M.; Bettini, S. (1977).- Leishmaniasis in Tuscany (Italy). 1. An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto Province. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71: 315-321.
- 117.- Maroli, M.; Gramiccia, M.; Gradoni, L. (1987).- Natural infection of sandfly *Phlebotomus perfiliewi* Parrot, 1930 with *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi región (Italy). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 596-598.
- 118.- Maroli, M.; Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Troiani, M.; Ascioni, R. (1994).- Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* with MON-72 zymodeme of *Leishmania infantum* in the Campania region of Italy. *Acta tropica.*, 57: 333-335.
- 119.- Marrugat i Fontanals, O. (1992).- Estudi faunistic i fenològic dels flebotomos de Pradell de la Teixeta. Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 217 pp.
- 120.- Martín Sanchez, J. (1992).- **Identificación del agente etiológico de las leishmaniosis en sus diferentes hospedadores, canino, humano y flebotomo vector, en el sudeste de España: Aplicación de la técnica de electroforesis de isoenzimas.** Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 286 pp.
- 121.- Martín-Sánchez, J.; Guilvard, E.; Acedo-Sánchez, C.; Wolf-Echeverri, M.; Sanchís-Marin, M.; Morillas-Márquez, F. (1994).- *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1991, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the province of Granada (Southern Spain). *International Journal for Parasitology*, 24: 405-408.
- 122.- Martín Sanchez, J.; Morillas Márquez, F.; Acedo Sanchez, C.; Sanchís Marin, M.C. (1995).- The variability of the etiological agent of leishmaniasis in the north-east of the Almería Region, south-east Spain. *Systematic Parasitology*, 30: 233-238.
- 123.- Martínez Cruz, M.S.; Martínez Moreno, A.; Martínez Moreno, F.J.; Martínez Gomez, F.; Hernandez Rodriguez, S. (1990). Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 50: 1-7.
- 124.- Martínez Ortega, E. (1984).- *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 posible vector de la Leishmaniasis cutánea (Diptera, Psychodidae). *Rev. Ibér. Parasitol.*, 44: 59-64.
- 125.- Martínez Ortega, E. (1984).- Fenología de *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) (Dip. Psychodidae, Phlebotominae) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín Asoc. esp. Entom.*, 8: 35-39.
- 126.- Martínez Ortega, E. (1986).- **Los flebotomos (Diptera, Psychodidae) del Sureste de la Península Ibérica.** Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 258 pp.
- 127.- Martínez Ortega, E. (1986).- Biología de los flebotomos ibéricos (Diptera, Psychodidae) en condiciones naturales. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 22: 73-78.
- 128.- Martínez Ortega, E.; Belmonte, A.; Gállego, M. (1989).- Trois cas de gynandromorphisme chez *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) dans la Péninsule Ibérique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 64: 46-52.
- 129.- Martínez Ortega, E.; Conesa Gallego, E. (1987).- Fenología de los flebotomos del subgénero *Larrousius* (Dip. Psychodidae, *Phlebotomus*) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín Asoc. esp. Entom.*, 11: 293-300.

- 130.- Martínez Ortega, E.; Conesa Gallego, E. (1987).- Fenología de *Phlebotomus papatasi* y *Phlebotomus sergenti* (Dipt. Psychodidae) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín Asoc. esp. Entom.*, 11: 313-319.
- 131.- Martínez Ortega, E.; Conesa Gallego, E.; Díaz Sánchez, F. (1988).- Aportación al conocimiento de los flebotomos (Diptera, Psychodidae) de las Islas Canarias. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 48: 89-93.
- 132.- Martínez Ortega, E.; Romero, H.; Conesa-Gallego, E.; Goyena, M. (1991).- Estudio comparado de la antropofilia y el fototropismo de los flebotomos en un foco de leishmaniasis del sureste de la Península Ibérica. *Parassitologia*, 33: 413-419.
- 133.- Martínez Ortega, E.; Ward, R.D.; Martín Luengo, F.; Conesa Gallego, E. (1982).- Introducción al estudio de Flebotomos en Alicante y Murcia. *Rev. Ibér. Parasitol.*, Vol. Extra.: 461-472.
- 134.- Marty, P.; Jambou, D.; Bayada, M.; Jourdain, N.; Haas, P.; Le Fichoux, Y. (1986).- Premières enquêtes prospectives sur la leishmaniose canine dans trois localités du département des Alpes Maritimes. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 4: 21-24.
- 135.- Marty, P.; Ozon, C.; Jambon, R.; Bayada, M.; Haas, P.; Le Fichoux, Y. (1988).- Nouvelles enquêtes prospectives sur la leishmaniose canine dans le departament des Alpes Maritimes. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 6: 3-6.
- 136.- Matas, B. y Rovira, J. (1989).- Estudio epidemiológico de la leishmaniosis canina en la isla de Mallorca. Publicaciones de la Conselleria de Sanitat i Seguretat Social del Govern Balear, 110 pp.
- 137.- Mercadé i Nubiola, Ll. (1974).- Atlas de Catalunya. Geogràfic, Econòmic i Històric. Diàfora S.A., Barcelona, 80 pp.
- 138.- Mezquida Lopez, G. (1990).- Estudio poblacional de los flebotomos (Diptera: Psychodidae) del Bajo Llobregat. Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 294 pp.
- 139.- Molero, J. (1976).- Estudio florístico y fitogeográfico de la Sierra del Montsant y su área de influencia. Tesis Doctoral Fac. Farmacia. Univ. Barcelona, 450 pp.
- 140.- Molina, R.; Amela, C.; Nieto, J.; San-Andrés, M.; González, F.; Castillo, J.A.; Lucientes, J.; Alvar, J. (1994).- Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88: 491-493.
- 141.- 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. Thèse Doctoral, Université des Sciences et Techniques du Languedo, Montpellier, Francia, 242 pp.
- 142.- Moreno, G.; Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Pralong, F.; Serres, E. (1986).- Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et Nouveau Monde. In: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. IMEEE, Montpellier: 105-117.
- 143.- Morillas Márquez, F. (1982).- Epidemiología de la leishmaniosis en la provincia de Granada: Estudio biométrico, sistemático y del ciclo anual de los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae). Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 256 pp.

- 144.- Morillas Márquez, F.; Benavides Delgado, I.; Gonzalez Castro, J.; Reyes Magaña, A.; Valero Lopez, A. (1985).- Ocurrence of *Leishmania* sp. in *Rattus rattus* in the province of Granada. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 60: 768-770.
- 145.- Morillas Márquez, F.; Guevara Benitez, D.C.; Ubeda Ontiveros, J.M.; Gonzalez Castro, J. (1983).- Fluctuations annuelles des populations de Phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 58: 625-632.
- 146.- Morillas Márquez, F.; Léger, N.; Pesson, B.; Perrotey, S. (1995).- Phlebotomine sandflies bio-geography in the Canary Islands (Spain). *Resúmenes de II ISOPS, Mérida (Venezuela)*: 67.
- 147.- Morillas Márquez, F.; Sanchís Marín, M.C.; Martín Sánchez, J.; Acedo Sánchez, C. (1991).- On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Almería in southeastern Spain. *Parassitologia*, 33: 437-444.

N

- 148.- Nieto, C.; Habela, M.; Serrano, F.; Reina, D.; Navarrete, I. (1989).- Encuesta epidemiológica de la leishmaniosis canina en la comarca de Cáceres. *Resúmenes del I Congreso Ibérico de Parasitología/VI Congreso Nacional de Parasitología, Cáceres*: 196.

O

- 149.- O.M.S. (1977).- Le Titrage avec immunoabsorbant lié à une enzyme (ELISA). *Bull. Organ. Mond. Santé.* 55 : 557-568.
- 150.- O.M.S. (1984).- Las leishmaniosis. Informe de un comité de expertos de la O.M.S. *Serie Informes Técnicos*, 701: 151 pp.

P

- 151.- Panareda, C.; Rius, J.M.; Vives, J.M. (1989).- *Guía de Catalunya. Todos los pueblos y todas las comarcas*. Edit. Caixa de Catalunya: 227-231.
- 152.- Pappas, M.G. (1986).- Rapid serodiagnosis of parasitic infections by Dot-ELISA using "dipsticks". (Correspondance). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 80: 1006.
- 153.- Pappas, M. G.; Hajkowski, R.; Cannon, L. T., Sr.; Hockmeyer, W. T. (1984).- Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): comparison with standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 14: 239-249.

- 154.- Pappas, M. G.; Hajkowsky, R.; Diggs, C.L.; Hockmeyer, W.T. (1983).- Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (Dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. (Correspondance). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 425-426.
- 155.- Pappas, M.G.; Hajkowsky, R.; Diggs, C.L.; Hockmeyer, W.T. (1985).- Disposable nitrocelulose filtration plates simplify the dot-ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. (Correspondance). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 136.
- 156.- Pappas, M.G.; Hajkowsky, R.; Hockmeyer, W.T. (1983).- Dot-enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Methods.*, 64: 205-214.
- 157.- Pappas, M. G.; Hajkowsky, R.; Hockmeyer, W.T. (1984).- Standarization of the dot enzyme-Linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33: 1n105-1n111.
- 158.- Pappas, M.G.; Hajkowsky, R.; Tang, D.B.; Hockmeyer, W.T. (1985).- Reduced false positive reactions in the dot-enzyme-linked immunosorbent assay for human visceral leishmaniasis. *Chem. Immunol. Immunopathology.*, 34: 392-396.
- 159.- Pinelli, E.; Killick-Kendrick, M.; Wagenaar, J.; Beernardia, W.; del Real, G.; Ruitenberg, J. (1994).- Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, 62: 229-235.
- 160.- Pires, C.A. (1984).- Les Phlébotomes du Portugal. I. Infestation naturelle des *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 par *Leishmania*, dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 59: 521-524.
- 161.- Pires, C.A. (1985).- Os flebótomos de Portugal (Insecta, Diptera, Psychodidae). II. Distribuição, variação anual e altitudinal dos flebótomos do foco zoonotico de Arrábida. *Actas do II Congresso Ibérico de Entomologia*, Lisboa: 83-94.
- 162.- Pires, C.A.; Santos-Gomes, G.M.; Pratlong, F.; Ribeiro, H.; Campino, L.; Abranches, P. (1991).- Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 66: 47-48.
- 163.- Portús, M.; Fisa, R.; Serra, T.; Gállego, M.; Mora, R. (1987).- Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. *Med. Vet.*, 4: 44-48.
- 164.- Portús, M.; Gállego, J.; Rioux, J.A.; Pratlong, F.; Moreno, G.; Fisa, R.; Gállego, M.; Muñoz, C.; Riera, C.; Sánchez, F.; Serra, T. (1989).- Enzymatic heterogeneity among strains of *Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniosis in Catalonia (Spain). *Rev. Ibér. Parasitol.*, 49: 287-289.
- 165.- Portús, M.; Rioux, J.A.; Gállego, J.; Lanotte, G.; Pratlong, F.; Moreno, G. (1986).- Les leishmanioses en Catalogne (Espagne). A propos de l'identification enzymatique de neuf souches d'origine humaine et canine. *In: Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. IMEEE, Montpellier: 433-438.
- 166.- Pozio, E.; Gradoni, L.; Bettini, S.; Gramiccia, M. (1981).- Leishmaniasis in Tuscany (Italy).VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.* 38: 383-393.
- 167.- Pozio, E.; Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Amerio, P. (1985).- Isolation of the agent causing cutaneous leishmaniasis in Italy and its visceralization in inbred hamsters. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 260-261.

- 168.- Pralong, F.; Dedet, J.P.; Marty, P.; Portús, M.; Deniau, M.; Dereure, J.; Abranches, P.; Reynes, J.; Martini, A.; Lefebvre, M.; Rioux, J.A. (1995).- *Leishmania*-Human Immunodeficiency virus co-infection in the Mediterranean Basin: isoenzymatique characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *Journal of Infectious Disease*, 172: 323-326.
- 169.- Pralong, F.; Portús, M.; Rispail, P.; Moreno, G.; Bastien, P.; Rioux, J.A. (1989).- Présence simultanée chez le chien de deux zymodemes du complexe *Leishmania infantum*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 64: 312-314.
- 170.- Preswood, W.G.(1981).- *In: Membrane Filtration. Applications and Problems.* Edit. B.J. Anika Marcel Dekker, New York (En Tijseen, 1986).

R

- 171.- Ready, P.D.; Croset, H. (1980).- Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera, Psychodidae) from southern France. *Bull. Entomol. Res.*, 70: 511-523.
- 172.- Reyes Magaña, A.; Morillas Márquez, F.; Valero López, A.; Gonzalez Castro, J.; Benavides Delgado, I.; Sanchís 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: 233-240.
- 173.- Riera, C.; Torras, S.; Gállego, M.; Fisa, R.; Pralong, F.; Colmenares, M., de; Aisa, M.J.; Martini, A.; Portús, M.; GCEL. (1994).- Estudio de la asociación VIH-*Leishmania* en Cataluña durante el periodo 1990-1994 a través de los datos recogidos por el GCEL. Resúmenes de la X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles, Sitges: 9.
- 174.- Rioux, J.A.; Aboulker, J.P.; Lanotte, G.; Killick-Kendrick, R.; Martini-Dumas, A. (1985).- Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 21. Influence de la température sur le développement de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Étude expérimentale. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 60: 221-229.
- 175.- Rioux, J.A.; Albaret, J.L.; Houin, R.; Dedet, J.P.; Lanotte, G. (1968).- Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes* L.). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 4: 421-428.
- 176.- Rioux, J.A.; Croset, H.; Lanotte, G. (1977).- Écologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation. *Coll. Int. CNRS*, N° 39: 295-305.
- 177.- Rioux, J.A.; Gállego, J.; Jarry, D.M.; Guilvard, E.; Maazoun, R.; Périères, J.; Becqueriaux, L.; Belmonte, A. (1983).- Un Phlébotome nouveau pour l'Espagne *Phlebotomus (Adlerius) mascittii* Grassi, 1908. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 59: 421-425.
- 178.- Rioux, J.A.; Golvan, Y.J.- Épidémiologie des leishmanioses dans le sud de la France. Institut National de Santé et de la Recherche Médical (INSERM). Paris. *Monographie INSERM*, 37: 223 pp.
- 179.- Rioux, J.A.; Golvan, Y.J.; Croset, H.; Houin, R.; Juminer, B.; Bain, O.; Tours, S. (1967).- Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 1. Les phlébotomos, Echantillonnage-Ethologie. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 42: 561-603.
- 180.- Rioux, J.A.; Golvan, Y.J.; Croset, H.; Houin, R.; Tours, S. (1968).- Enquête écologique sur les leishmanioses dans le sud de la France. *Bull. de l'INSERM*, 23: 1125-1164.

- 181.- Rioux, J.A.; Golvan, Y.J.; Houin, R.; Croset, H.; Tour, S., (1970).- Résultats d'un enquête écologique sur le foyer leishmanien des Cévennes meridionales. *Revue de Médecine*, **18**: 1039-1052.
- 182.- Rioux, J.A.; Goubert, J.R.; Lanotte, G.; Roustan, J.; Marco, A. (1980).- Un cas de leishmaniose autochtone de la muqueuse nasale. *Les Cahiers d'O.R.L.*, **15**: 423-425.
- 183.- Rioux, J.A.; Guilvard, E.; Gállego, J.; Moreno, G.; Pratlong, F.; Portús, M.; Rispaill, P.; Gállego, M.; Bastien, P. (1986).- *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer. Infestation par deux zymodemes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). In: *Leishmania: Taxonomie et Phylogenèse. Applications éco-épidémiologiques*. IMEEE, Montpellier: 439-444.
- 184.- Rioux, J.A.; Jarry, D.M.; Lanotte, G.; Maazoun, R.; Killick-Kendrick, R. (1984).- Écologie 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**: 331-333.
- 185.- Rioux, J.A.; Killick-Kendrick, R.; Leaney, A.J.; Turner, P.P.; Bailly, M.; Young, C.J. (1979).- Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 12. Dispersion horizontale de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Expériences préliminaires. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **54**: 673-682.
- 186.- Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Croset, H.; Dedet, J.P. (1972).- Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 5. Pouvoir infestant comparée des diverses formes de leishmaniose canine vis-à-vis de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **47**: 413-419.
- 187.- Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Destombes, Y.; Vollhardt, Y.; Croset, H. (1971).- Leishmaniose expérimentale du Renard *Vulpes vulpes* (L.). *Récueil de Médecine Vétérinaire*, **147**: 489-498.
- 188.- Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Maazoun, R.; Perello, R.; Pratlong, F. (1980).- *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent du bouton d'orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *C.r. Acad. Sci., Paris*, **291**, sér D: 701-703.
- 189.- Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Périères, J.; Croset, H. (1973).- Écologie 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**: 519-522.
- 190.- Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Pratlong, F.; Dereure, J.; Jarry, D.; Moreno, G.; Killick-Kendrick, R.; Périères, J.; Guilvard, E.; Belmonte, A.; Portús, 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.
- 191.- Rioux, J.A.; Léger, N.; Houin, R. Lanotte, G.; Deniau, M. y Tasei, J.P. (1972).- Premiers résultats d'une enquête épidémiologique en Corse. *Corse Mediterr. Med.*, **18**: 89-100.
- 192.- Rivas, C.I.; Marsilla, B.A. (1990).- Evolución y control de la leishmaniosis en la región de Murcia. Resúmenes del Congreso de Zoonosis, 1er Interautonómico Español, Valencia: 164.
- 193.- Romano Basarte, C.; Sanchez Acedo, C.; Castillo Hernandez, J.A.; Lucientes Curdi, J.; Peribañez López, M.A.; Benito de Martin, I. (1991).- Epidemiología de la leishmaniosis canina en la Ribera Estellesa y Tudelana de Navarra (España). Resúmenes del ICASEP I, Valencia: 307.

- 194.- Rosado, D.; Arrieta, E.; García-Alonso, M.; Nieto, C.G.; Navarrete, I. (1995).- Especies de flebotomos (Diptera, Psychodidae) presentes en áreas urbanas y periurbanas de la ciudad de Cáceres (España). Resúmenes del IV Congreso Ibérico de Parasitología, Santiago de Compostela: 124-125.
- 195.- Rosado, D.; Arrieta, E.; Morillas Márquez, F.; Nieto, C.G.; Navarrete, I. (1995).- Estudio preliminar sobre la fenología de los flebotomos (Diptera, Psychodidae) en la ciudad de Cáceres.. Resúmenes del IV Congreso Ibérico de Parasitología, Santiago de Compostela: 125.
- 196.- Rovira i Hernandez, A. (1990).- **Sobre la fauna de flebotoms de l'area de Montserrat**. Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 231 pp.

S

- 197.- Sanchís Marin, M.C.; Morillas Márquez, F.; Martín Sanchez, J.; Acedo Sanchez, C.; Gonzalez Castro, J. (1991).- La leishmaniosis en la provincia de Almería: estudio del reservorio canino y del agente vectorial en la zona del nordeste. Resúmenes del ICASEP I, Valencia: 308.
- 198.- Sanchís Marin, M.C.; Morillas Márquez, F.; Sanchez Acedo, C.; Martín Sanchez, J.; Gonzalez Castro, J. (1989).- Prevalencia de la leishmaniosis canina en la provincia de Almería. Resúmenes del I Congreso Ibérico de Parasitología/VI Congreso Nacional de Parasitología, Cáceres: 211.
- 199.- Sanchís Marin, M.C.; Villegas, G.; Morillas Márquez, F. (1986).- Flebotomos y leishmaniosis en la provincia de Almería. *Rev. San. Hig. Pub.*, 60: 1131-1139.
- 200.- Scott, J.M.; Shreffler, W.G.; Ghalib, H.W.; El Asad, A.; Siddig; Badaro, R.; Reed, S.G. (1991).- A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44: 272-277.
- 201.- Seguí, M^aG. (1991).- **Estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la isla de Menorca**. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 324 pp.
- 202.- Seguí, M^aG. (1991).- Estudi epidemiològic de la leishmaniosi a l'illa de Menorca. *Rev. Cien. (IEB)*, 9: 91-101.
- 203.- Seguí, M^aG.; Valls, D.; Fisa, R.; Gállego, M.; Portús, M. (1990).- Estandarización de las condiciones de conservación y elución de muestras de sangre recogidas en papel de filtro para el estudio serológico de las leishmaniosis. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 50: 323-328.
- 204.- Serra, T.; Dedet, J.P.; Pratlong, F.; Ramírez, A.; Arteaga, E.; Altés, J.; Gallegos, C. Sanchez, J.; GELB (1994).- Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en las Islas Baleares. Resúmenes de la X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles, Sitges: 11.
- 205.- Srivastava, L.; Singh, V.K (1988).- Diagnosis of Indian Kala-azar by dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA). *Ann. Trop. Med. Hyg.*, 82: 331-334.

T

- 206.- Tijssen, 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.
- 207.- Torras, S. (1993).- **Puesta a punto y ensayo de una técnica ELISA para el diagnóstico de la leishmaniosis canina.** Tesina de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 92 pp.
- 208.- Torras, S.; Riera, M.C.; Aisa, M.J.; de Colmenares, M.; Gállego, M.; Castillejo, S.; Valls, D.; Valladares, B.; Portús, M. (1993).- **Puesta a punto y ensayo de una técnica ELISA para el diagnóstico de la leishmaniosis canina.** Resúmenes del III Congreso Ibérico de Parasitología/VIII Congreso Nacional de Parasitología, Lisboa: 324.
- 209.- Torras, S.; Riera, M.C.; Aisa, M.J.; de Colmenares, M.; Gállego, M.; Fisa, R.; Portús, M. (1993).- **Diagnóstico de la leishmaniosis canina mediante ELISA. Comparación con las técnicas de "Dot-Blot" y "Western-Blot".** Resúmenes del III Congreso Ibérico de Parasitología/VIII Congreso Nacional de Parasitología, Lisboa: 325.

V

- 210.- Vattier-Bernard, G.; Trouillet, J. (1983).- **Phlébotomes de Mayombe congolais (Diptera, Pscodidae). Étude phénologique.** *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 58: 391-401.

W

- 211.- Wallis, C.; Melnick, J.L.; Gerba, C.P.(1979).- *Ann. Rev. Microbiol.*, 33: 413. (En Tijssen, 1986).
- 212.- WHO/LEISH/95.35.- **Report on the consultative Meeting on *Leishmania*/HIV co-infection.** Co-sponsored by the Instituti Superiore di Sanita and the Division of Control of Tropical Diseases (CTD), World Health Organization, 14 pp.

VIII.- ANEXO

VIII.- ANEXO

ANEXO 1.- RELACIÓN DE LOS PERROS ANALIZADOS

Nº registro: 1

Localidad Torroja
 Dueño 1
 Dirección A-333
 Perro Dolça
 Fecha de nacimiento 08.1990
 Raza Ratonero
 Sexo H
 Pelo C
 Actividad caza

05.1991 Nº: 1
 Edad: 9 m
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

03.1992 Nº: 3
 Edad: 1 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

05.1992 Nº: 4
 Edad: 1 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo de ganglio poplíteo izquierdo

N° registro: 2

Localidad Torroja
Dueño 1
Dirección A-33
Perro Lina
Fecha de nacimiento 1986
Raza Cruce
Sexo H
Pelo M
Actividad caza

05.1991 N°: 2
 Edad: 5 a
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/800

03.1992 N°: 2
 Edad: 6 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/800

05.1992 N°: 2
 Edad: 6 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: sintomático
 Dot p: 1/1600
 Cult. ganglio: pos (BCN-74)
 ZM.: MON-77
 Cult. méd. ósea: no hecho
 ZM.:
 Cult. piel sana: pos (BCN-81)
 ZM.: MON-1

Observaciones Cultivo de ganglio poplíteo izquierdo
 Sintomatología: adenopatía de ganglio poplíteo, llagas, úlceras en las rodillas, onicogriposis

Nº registro: 3

Localidad Torroja
Dueño 2
Dirección B-13
Perro Ringo
Fecha de nacimiento 1990
Raza Cruce
Sexo M
Pelo L
Actividad huerto

05.1991 Nº: 3
 Edad: 1a
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

03.1992 Nº: 8
 Edad: 2 a
 Peso: 14 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

05.1992 Nº: 1
 Edad: 2 a
 Peso: 14 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo de ganglio submandibular; tamaño muy pequeño

Nº registro: 4

Localidad Torroja
 Dueño 3
 Dirección C-17
 Perro Perla
 Fecha de nacimiento 01.1989
 Raza Cruce
 Sexo H
 Pelo M
 Actividad huerto

05.1991 Nº: 4
 Edad: 2 a
 Peso: 30 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

03.1992 Nº: 11
 Edad: 3 a
 Peso: 60 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana sana:
 ZM.:

Observaciones

Nº registro: 5

Localidad Torroja
 Dueño 4
 Dirección D-19
 Perro Duc
 Fecha de nacimiento 1985
 Raza Cruce
 Sexo M
 Pelo M
 Actividad

05.1991 Nº: 5
 Edad: 6 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/200

03.1992 Nº: 7
 Edad: 7 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/200

05.1992 Nº: 20
 Edad: 7 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo de ganglio poplíteo izquierdo

N° registro: 6

Localidad Torroja
Dueño 5
Dirección E-7
Perro Lasi
Fecha de nacimiento 03.1986
Raza Pastor alemán
Sexo M
Pelo M
Actividad huerto

05.1991 N°: 6
 Edad: 5 a
 Peso: 30 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/200

03.1992 N°: 10
 Edad: 6 a
 Peso: 40 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/400

05.1992 N°: 13
 Edad: 6 a
 Peso: 40 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/400
 Cult. ganglio: pos (BCN-86)
 ZM.: MON-1
 Cult. méd. ósea: pos (BCN-85)
 ZM.: MON-1
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo de ganglio poplíteo izquierdo; tamaño normal

N° registro: 7

Localidad Torroja
Dueño 6
Dirección F-2
Perro Estrella
Fecha de nacimiento 1988
Raza Cruce de labral
Sexo H
Pelo L
Actividad caza

05.1991 N°: 7
 Edad: 3 a
 Peso: 16 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

03.1992 N°: 14
 Edad: 4 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/200

05.1992 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana sana:
 ZM.:

Observaciones En 05.1992 está viva

Nº registro: 8

Localidad Torroja
Dueño 7
Dirección F-27
Perro Rus
Fecha de nacimiento 09.1990
Raza Cruce de basset
Sexo M
Pelo C
Actividad

05.1991 Nº: 8
 Edad: 8 m
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº: 21
 Edad: 1 a
 Peso: 20 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

Nº registro: 9

Localidad Torroja
Dueño 8
Dirección G-47
Perro Faluga 1
Fecha de nacimiento 1980
Raza Cruce
Sexo H
Pelo C
Actividad pastoreo

05.1991 Nº: 9
 Edad: 11 a
 Peso: 20 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/400

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº: 17
 Edad: 12 a
 Peso: 20 Kg
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: 1/200
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo del ganglio poplíteo izquierdo
 Sintomatología: adenopatías de ganglio poplíteo

Nº registro:10

Localidad Torroja
Dueño 8
Dirección G-47
Perro Punxat
Fecha de nacimiento 07.1987
Raza Cruce
Sexo M
Pelo M
Actividad pastoreo

05.1991 Nº: 10
 Edad: 4 a
 Peso:
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/400

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº: 19
 Edad: 5 a
 Peso:
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: 1/800
 Cult. ganglio: pos (BCN-75)
 ZM.: MON-1
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo del ganglio poplíteo izquierdo
 Sintomatología: adenopatías de ganglio poplíteo

N° registro:11

Localidad Torroja
Dueño 8
Dirección G-47
Perro Negret
Fecha de nacimiento 07.1989
Raza Cruce
Sexo M
Pelo L
Actividad pastoreo

05.1991 N°: 11
 Edad: 2 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/800

03.1992 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 N°: 16
 Edad: 3 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: sintomático
 Dot p: 1/3200
 Cult. ganglio: pos (BCN-78)
 ZM.: MON-1
 Cult. méd. ósea: pos (BCN-79)
 ZM.: MON-1
 Cult. piel sana y lesión: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo del ganglio poplíteo izquierdo y de una zona con descamaciones y alopecia del dorso del cuello
 Sintomatología: depilaciones alrededor de los ojos y en las orejas, descamación, alopecia, hiperqueratosis, onicogriposis, adenopatías, debilidad de las patas posteriores

Nº registro:12

Localidad Torroja
Dueño 9
Dirección F-18
Perro Doreta
Fecha de nacimiento 1985
Raza Cruce
Sexo M
Pelo L
Actividad huerto

05.1991 Nº: 13
 Edad: 6 a
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones En 1992 está viva

Nº registro:13

Localidad Torroja
 Dueño 9
 Dirección F-18
 Perro Moreta
 Fecha de nacimiento 1980
 Raza Cruce
 Sexo H
 Pelo C
 Actividad huerto

05.1991 Nº: 14
 Edad: 11 a
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/200

03.1992 Nº: 9
 Edad: 12 a
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/400

05.1992 Nº: 7
 Edad: 12 a
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/1600
 Cult. ganglio: pos (BCN-83)
 ZM.: MON-1
 Cult. méd. ósea: pos (BCN-82)
 ZM.: MON-1
 Cult. piel sana: pos (BCN-84)
 ZM.: MON-1

Observaciones Cultivo de ganglio poplíteo izquierdo

Nº registro:14

Localidad Torroja

Dueño 2

Dirección B-13

Perro Dick

Fecha de nacimiento 02.1991

Raza Cruce

Sexo H

Pelo L

Actividad

05.1991 Nº: 15
 Edad: 3 m
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

Nº registro:15

Localidad Torroja
 Dueño 6
 Dirección F-2
 Perro Laser
 Fecha de nacimiento 1984
 Raza Cruce
 Sexo M
 Pelo C
 Actividad caza

05.1991 Nº: 16
 Edad: 7 a
 Peso: 23 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

03.1992 Nº: 17
 Edad: 8 a
 Peso: 23 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 Nº: 10
 Edad: 8 a
 Peso: 23 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo de ganglio poplíteo derecho

Nº registro:16

Localidad Torroja
Dueño 6
Dirección F-2
Perro Linda
Fecha de nacimiento 1988
Raza Cruce de lebel
Sexo H
Pelo L
Actividad caza

05.1991 Nº: 17
 Edad: 3 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

03.1992 Nº: 13
 Edad: 4 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones En 05.1992 está viva

Nº registro:17

Localidad Torroja
 Dueño 10
 Dirección D-49
 Perro Lara
 Fecha de nacimiento 09.1988
 Raza Cruce
 Sexo H
 Pelo L
 Actividad

05.1991 Nº: 18
 Edad: 2 a
 Peso: 40 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/400

03.1992 Nº: exitus
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

Nº registro:18

Localidad Torroja
Dueño 8
Dirección G-47
Perro Griset
Fecha de nacimiento 01.1990
Raza Cruce
Sexo M
Pelo M
Actividad pastoreo

05.1991 Nº: 19
 Edad: 1 a
 Peso:
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/400

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

N° registro:19

Localidad Torroja
Dueño 6
Dirección F-2
Perro Nina
Fecha de nacimiento 1989
Raza Cruce
Sexo H
Pelo C
Actividad caza

05.1991 N°: 20
 Edad: 2 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

03.1992 N°: 16
 Edad: 3 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/200

05.1992 N°: 9
 Edad: 3 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/200
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo de ganglio popliteo derecho; tamaño pequeño

Nº registro: 20

Localidad Torroja
Dueño 6
Dirección F-2
Perro Gilda
Fecha de nacimiento 07.1990
Raza Cruce
Sexo H
Pelo M
Actividad caza

05.1991 Nº: 21
 Edad: 10 m
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/200

03.1992 Nº: 19
 Edad: 1 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

05.1992 Nº: 12
 Edad: 1 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo de ganglio submandibular derecho. Ganglio poplíteo imperceptible

Nº registro: 21

Localidad Torroja
 Dueño 11
 Dirección A-30
 Perro Yadi
 Fecha de nacimiento 1989
 Raza Cruce
 Sexo H
 Pelo C
 Actividad

05.1991 Nº: 22
 Edad: 2 a
 Peso: 25 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones En 1992 está viva

Nº registro: 22

Localidad Torroja
Dueño 12
Dirección H-12
Perro Tuca
Fecha de nacimiento 01.1989
Raza Cruce de setter
Sexo H
Pelo L
Actividad

05.1991 Nº: 23
 Edad: 2 a
 Peso: 10 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

N° registro: 23

Localidad Torroja
Dueño 10
Dirección D-49
Perro Brisa
Fecha de nacimiento 1990
Raza Cruce de terrier
Sexo H
Pelo L
Actividad

05.1991 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 N°: 1
 Edad: 2 a
 Peso: 20 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

Nº registro: 24

Localidad Torroja
 Dueño 11
 Dirección A-30
 Perro Tom
 Fecha de nacimiento 1991
 Raza Cruce
 Sexo M
 Pelo L
 Actividad

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 4
 Edad: 1 a
 Peso: 13 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 Nº: 15
 Edad: 1 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo de ganglio poplíteo izquierdo

Nº registro: 25

Localidad Torroja
Dueño 11
Dirección A-30
Perro Gesi
Fecha de nacimiento
Raza Cruce
Sexo M
Pelo L
Actividad

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 5
 Edad:
 Peso: 17 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

05.1992 Nº: 5
 Edad:
 Peso: 17 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo ganglio poplíteo izquierdo

Nº registro: 26

Localidad Torroja
Dueño 11
Dirección A-30
Perro Tota
Fecha de nacimiento 1990
Raza Cruce
Sexo H
Pelo M
Actividad huerto

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 6
 Edad: 2 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 Nº: 6
 Edad: 2 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo ganglio poplíteo izquierdo; pequeño tamaño

Nº registro: 27

Localidad Torroja
Dueño 14
Dirección I-21
Perro Suni
Fecha de nacimiento 09.1991
Raza Perdiguero
Sexo H
Pelo M
Actividad

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 12
 Edad: 6 m
 Peso: 16 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

05.1992 Nº: 14
 Edad: 8 m
 Peso: 16 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Cultivo ganglio poplíteo derecho

Nº registro: 28

Localidad Torroja
 Dueño 6
 Dirección F-2
 Perro Popi
 Fecha de nacimiento 1990
 Raza Podenco
 Sexo M
 Pelo M
 Actividad caza

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 15
 Edad: 2 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: neg

05.1992 Nº: 8
 Edad: 2 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana y lesión: neg
 ZM.:

Observaciones Sintomatología: úlceras en el vientre, adenopatía de ganglio poplíteo
 Cultivo ganglio poplíteo derecho; tamaño grande.
 Cultivo de piel sana y de las úlceras

N° registro: 29

Localidad Torroja
Dueño 6
Dirección F-2
Perro Quim
Fecha de nacimiento 10.1991
Raza Cruce
Sexo M
Pelo M
Actividad caza

05.1991 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 N°: 18
 Edad: 5 m
 Peso: 20 Kg
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: 1/200

05.1992 N°: 11
 Edad: 7 m
 Peso: 20 Kg
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: neg
 Cult. ganglio: neg
 ZM.:
 Cult. méd. ósea: neg
 ZM.:
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Sintomatología: llagas y depilaciones en las patas
 Cultivo ganglio poplíteo derecho

Nº registro: 30

Localidad Torroja
Dueño 6
Dirección F-2
Perro Jacky
Fecha de nacimiento 1975
Raza Cruce
Sexo H
Pelo M
Actividad compañía

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 20
 Edad: 17 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones Sintomatología: onicogrifosis
 En 05.1992 está vivo

Nº registro: 31

Localidad Torroja
Dueño 15
Dirección J-44
Perro Chispa
Fecha de nacimiento 1987
Raza Mestizo de pastor alemán
Sexo H
Pelo L
Actividad compañía

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 21
 Edad: 5 a
 Peso: 27 Kg
 Sint.: sintomático
 Dot p: 1/6400

05.1992 Nº: 3
 Edad: 5 a
 Peso: 27 Kg
 Sint.: sintomático
 Dot p: 1/6400
 Cult. ganglio: pos (BCN-76)
 ZM.: MON-1
 Cult. méd. ósea: pos (BCN-77)
 ZM.: MON-1
 Cult. piel sana: pos (BCN-89)
 ZM.: MON-1

Observaciones Sintomatología: costras en el hocico, adenopatías, depilaciones alrededor de los ojos, caspa abundante
 Cultivo ganglio poplíteo izquierdo

N° registro: 32

Localidad Torroja
Dueño 16
Dirección J-36
Perro Picada
Fecha de nacimiento 1990
Raza Cruce
Sexo H
Pelo L
Actividad

05.1991 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 N°: 22
 Edad: 2 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

Nº registro: 33

Localidad Torroja
Dueño 16
Dirección J-36
Perro Esquitx
Fecha de nacimiento 1989
Raza Cruce
Sexo M
Pelo M
Actividad

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 23
 Edad: 3 a
 Peso: 15 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: neg

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

Nº registro: 34

Localidad Torroja
Dueño 16
Dirección J-36
Perro Pitxi
Fecha de nacimiento 1985
Raza Cruce
Sexo M
Pelo M
Actividad

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 24
 Edad: 7 a
 Peso: 16 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/800

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

Nº registro: 35

Localidad Torroja
 Dueño 16
 Dirección J-36
 Perro Tarzán
 Fecha de nacimiento 1978
 Raza Cruce
 Sexo M
 Pelo C
 Actividad

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº: 25
 Edad: 14 a
 Peso: 12 Kg
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones Sintomatología: depilaciones en el hocico y una pata, úlceras en las orejas, caspa

N° registro: 36

Localidad Torroja
Dueño 17
Dirección K
Perro Diana
Fecha de nacimiento 1987
Raza Cruce
Sexo H
Pelo L
Actividad

05.1991 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 N°: 26
 Edad: 5 a
 Peso: 20 Kg
 Sint.: asintomático
 Dot p: 1/100

05.1992 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones

N° registro: 37

Localidad Torroja
Dueño 17
Dirección K
Perro Ploma
Fecha de nacimiento
Raza Cruce
Sexo H
Pelo L
Actividad

05.1991 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 N°: 27
 Edad:
 Peso: 18 Kg
 Sint.: sintomático
 Dot p: 1/6400

05.1992 N°:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:
 Cult. ganglio:
 ZM.:
 Cult. méd. ósea:
 ZM.:
 Cult. piel sana:
 ZM.:

Observaciones Sintomatología: depilaciones en las patas, crostas en las orejas, onicogriphosis, caspa

Nº registro: 38

Localidad Torroja
Dueño 8
Dirección G-47
Perro Petit
Fecha de nacimiento 1988
Raza Cruce
Sexo M
Pelo M
Actividad pastoreo

05.1991 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

03.1992 Nº:
 Edad:
 Peso:
 Sint.:
 Dot p:

05.1992 Nº: 18
 Edad: 3 a
 Peso:
 Sint.: oligosintomático
 Dot p: 1/400
 Cult. ganglio: pos (BCN-87)
 ZM.: MON-1
 Cult. méd. ósea: pos (BCN-88)
 ZM.: MON-1
 Cult. piel sana: neg
 ZM.:

Observaciones Es hijo de la Faluga 1 (nº registro 9)
 Sintomatología: adenopatías de los ganglio poplíteos
 Cultivo ganglio poplíteo derecho

Nº registro: 39

Localidad Margalef
Dueño 19
Dirección
Perro Navette
Fecha de nacimiento 1977
Raza Setter
Sexo H
Pelo L
Actividad compañía

05.1991 Nº: 1
Edad: 14 a
Peso: 13 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 2
Edad: 15 a
Peso: 16 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones Vive en Francia (Fointanebleau) pero pasa los veranos en Margalef

Nº registro: 40

Localidad Margalef
Dueño 20
Dirección L-17
Perro Ringo
Fecha de nacimiento 1990
Raza Sabueso
Sexo M
Pelo C
Actividad

05.1991 Nº: 2
Edad: 1 a
Peso: 15 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 11
Edad: 2 a
Peso: 18 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 41

Localidad Margalef
Dueño 21
Dirección L-7
Perro Estrella
Fecha de nacimiento 10.1986
Raza Podenco ibicenco
Sexo H
Pelo M
Actividad caza

05.1991 Nº: 3
Edad: 4 a
Peso: 15 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 5
Edad: 5 a
Peso: 13 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 42

Localidad Margalef
Dueño 20
Dirección L-17
Perro Linda
Fecha de nacimiento 11.1987
Raza Lebrel mallorquín
Sexo H
Pelo M
Actividad caza

05.1991 Nº: 4
Edad: 3 a
Peso: 17 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 9
Edad: 4 a
Peso: 14 Kg
Sint.: oligosintomático
Dot p: neg

Observaciones Sintomatología: depilaciones en las patas traseras

Nº registro: 43

Localidad Margalef
Dueño 20
Dirección L-17
Perro Sam
Fecha de nacimiento 1984
Raza Podenco
Sexo M
Pelo L
Actividad caza

05.1991 Nº: 5
Edad: 7 a
Peso: 18 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 10
Edad: 8 a
Peso: 17 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 44

Localidad Margalef
Dueño ZZ
Dirección M-19
Perro Gol
Fecha de nacimiento 1981
Raza Ovejero
Sexo M
Pelo L
Actividad pastoreo

05.1991 Nº: 6
Edad: 10 a
Peso: 18 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 16
Edad: 11 a
Peso: 28 Kg
Sint.: oligosintomático
Dot p: neg

Observaciones Sintomatología: depilaciones en la región del lomo, onicogriphosis

Nº registro: 45

Localidad Margalef
Dueño 23
Dirección N-9
Perro Tristán
Fecha de nacimiento 1989
Raza Cruce
Sexo M
Pelo C
Actividad compañía

05.1991 Nº: 7
Edad: 2 a
Peso: 8 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 4
Edad: 3 a
Peso: 10 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 46

Localidad Margalef
Dueño 24
Dirección O-7
Perro Duc
Fecha de nacimiento 1979
Raza Cruce
Sexo M
Pelo C
Actividad caza

05.1991 Nº: 8
Edad: 12 a
Peso: 15 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

Observaciones

Nº registro: 47

Localidad Margalef
Dueño 24
Dirección O-7
Perro Chata
Fecha de nacimiento 10.1988
Raza Lebel mallorquín
Sexo H
Pelo M
Actividad caza

05.1991 Nº: 9
Edad: 2 a
Peso: 13 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

Observaciones

Nº registro: 48

Localidad Margalef
Dueño 25
Dirección P-48
Perro Flecha
Fecha de nacimiento 1986
Raza Lebel mallorquín
Sexo H
Pelo M
Actividad caza

05.1991 Nº: 10
Edad: 5 a
Peso: 15 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 1
Edad: 6 a
Peso: 17 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 49

Localidad Margalef
Dueño 26
Dirección M-41
Perro Blanca
Fecha de nacimiento 01.1989
Raza Cruce de setter
Sexo H
Pelo L
Actividad caza

05.1991 Nº: 11
Edad: 2 a
Peso: 28 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 15
Edad: 3 a
Peso: 22 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 50

Localidad Margalef
Dueño 26
Dirección M-41
Perro Rambo
Fecha de nacimiento 1987
Raza Cruce de basset
Sexo M
Pelo C
Actividad caza

05.1991 Nº: 12
Edad: 4 a
Peso: 30 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

Observaciones

Nº registro: 51

Localidad Margalef
Dueño 26
Dirección M-41
Perro Dac
Fecha de nacimiento 04.1990
Raza Sabueso
Sexo M
Pelo M
Actividad caza

05.1991 Nº: 13
Edad: 1 a
Peso: 20 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

Observaciones

Nº registro: 52

Localidad Margalef
Dueño 27
Dirección Q-17
Perro Estel
Fecha de nacimiento 09.1986
Raza Perdiguero
Sexo M
Pelo C
Actividad caza

05.1991 Nº: 14
Edad: 4 a
Peso: 30 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 17
Edad: 5 a
Peso: 35 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

N° registro: 53

Localidad Margalef
Dueño 28
Dirección Q-11
Perro Sati
Fecha de nacimiento 06.1985
Raza Perdiguero
Sexo M
Pelo C
Actividad caza

05.1991 N°: 15
Edad: 5 a
Peso: 25 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 N°: 7
Edad: 6 a
Peso: 25 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 54

Localidad Margalef
Dueño 29
Dirección
Perro Spit
Fecha de nacimiento 1986
Raza Pequinés
Sexo M
Pelo M
Actividad compañía

05.1991 Nº: 16
Edad: 5 a
Peso: 12 Kg
Sint.: 12 Kg
Dot p: neg

05.1992 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

Observaciones Vive en Barcelona pero se desplaza a menudo a Margalef

Nº registro: 55

Localidad Margalef
Dueño 30
Dirección
Perro Panotxa
Fecha de nacimiento 1978
Raza Cruce
Sexo H
Pelo L
Actividad compañía

05.1991 Nº: 17
Edad: 13 a
Peso: 12 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

Observaciones Es de Hospitalet de Llobregat y pasa los veranos en Margalef

Nº registro: 56

Localidad Margalef
Dueño 26
Dirección M-41
Perro Negre
Fecha de nacimiento 01.1987
Raza Conejero
Sexo M
Pelo M
Actividad caza

05.1991 Nº: 18
Edad: 4 a
Peso: 12 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 6
Edad: 5 a
Peso: 15 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 57

Localidad Margalef
Dueño 31
Dirección Q9
Perro Sherif
Fecha de nacimiento 1986
Raza Cruce
Sexo M
Pelo C
Actividad caza

05.1991 Nº: 19
Edad: 5 a
Peso: 20 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 12
Edad: 6 a
Peso: 20 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 59

Localidad Margalef
Dueño 33
Dirección S-4
Perro Bonica
Fecha de nacimiento 1981
Raza Cruce de podenco
Sexo H
Pelo L
Actividad caza

05.1991 Nº: 21
Edad: 10 a
Peso: 20 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 13
Edad: 11 a
Peso: 20 Kg
Sint.: oligosintomático
Dot p: neg

Observaciones Sintomatología: depilaciones en las patas traseras, onicogriphosis

Nº registro: 60

Localidad Margalef
Dueño 33
Dirección S-4
Perro Din
Fecha de nacimiento 06.1988
Raza Lebel mallorquín
Sexo M
Pelo L
Actividad caza

05.1991 Nº: 22
Edad: 2 a
Peso: 18 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

05.1992 Nº: 8
Edad: 3 a
Peso: 20 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 61

Localidad Margalef
Dueño 34
Dirección M-41
Perro Flit
Fecha de nacimiento 06.1991
Raza Podenco
Sexo M
Pelo C
Actividad caza

05.1991 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

05.1992 Nº: 3
Edad: 11 m
Peso: 15 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 62

Localidad Margalef
Dueño 26
Dirección M-41
Perro Tom
Fecha de nacimiento 1989
Raza Pointer
Sexo M
Pelo C
Actividad caza

05.1991 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

05.1992 Nº: 14
Edad: 3 a
Peso: 24 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 63

Localidad Margalef
Dueño 24
Dirección O-7
Perro Dolça
Fecha de nacimiento 1991
Raza Podenco
Sexo H
Pelo C
Actividad caza

05.1991 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

05.1992 Nº: 18
Edad: 1 a
Peso: 14 Kg
Sint.: asintomático
Dot p: neg

Observaciones

Nº registro: 64

Localidad Margalef
Dueño 24
Dirección O-7
Perro Cuca
Fecha de nacimiento 1991
Raza Podenco mallorquín
Sexo H
Pelo C
Actividad caza

05.1991 Nº:
Edad:
Peso:
Sint.:
Dot p:

05.1992 Nº: 19
Edad: 1 a
Peso: 12 Kg
Sint.: oligosintomático
Dot p: neg

Observaciones Sintomatología: pápulas en las orejas, depilación en las patas

ANEXO 2.- PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACION**a.- Medio de cultivo: medio de Novy, McNeal y Nicolle (NNN)**Composición:

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

Preparación:

-**Agar:** se calienta el agua destilada a unos 80°C y se añade el NaCl. En forma de lluvia, se agrega el bacto-agar y se lleva a ebullición durante 5 minutos, con la precaución de agitar constantemente, para evitar la formación de grumos. La solución se distribuye, en tubos de ensayo (9 ml/tubo) y se procede a su esterilización en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La conservación de los medios se realiza a +4°C.

- **Sangre de conejo:** se obtiene por punción cardíaca, siguiendo la legislación vigente sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines.

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 extraída (40-50 ml) se pasa a un erlenmeyer estéril que contiene 3 ml de citrato sódico al 10% y 250.000 UI de penicilina sódica. Puede conservarse en nevera a +4°C durante una semana.

- **Mezcla del agar con la sangre:** 2 o 3 horas antes de su utilización se coloca la sangre a temperatura ambiente. Se deja fundir el agar en baño maria a 45°C o se mantiene líquido, a esta temperatura, después de proceder a su esterilización.

La incorporación de la sangre del conejo al agar se hace bajo campana de flujo laminar, en condiciones estériles, cuando la temperatura del agar es de aproximadamente 45°C. La homogeneización de la muestra se consigue con una agitación lenta en movimiento rotatorio. Se deja enfriar la mezcla colocando los tubos en posición inclinada.

El mantenimiento de los tubos a temperatura ambiente durante 24 h permite la exudación (fase líquida del medio en la que se produce el crecimiento del parásito, constituida por el agua que se condensa en la parte inferior de las paredes del agar. Esta exudación aumenta considerablemente al introducir el medio en un refrigerador). Transcurrido este tiempo se conserva a +4°C durante 3-4 semanas.

b.- Congelación de la cepa

La cepa MHOM/FR/78/LEM-75 se siembra en medio NNN en tubos y se hacen 10 resiembras. La fase líquida de los cultivos de 7-8 días de la última resiembra (3-4 tubos), que contiene los promastigotes, se junta en un tubo estéril, se coge una alícuota y se efectúa el recuento en cámara de Fuchs-Rosenthal. La concentración de promastigotes/ml debe ser de $3 \cdot 10^6$ (el número no debe ser en cualquier caso inferior a 2 Millones/ml).

La suspensión se reparte en 5 viales (Costar Bio-Freeze) de propileno de 1,8 ml, conteniendo, cada uno de ellos, glicerol a la concentración final del 10% (14) como agente protector (0,5 ml de la solución promastigotes, igual volumen de la solución salina estéril y 100 µl de glicerina pura). Se guarda un tubo de NNN con el cultivo de la cepa hasta proceder a la prueba de supervivencia.

Los viales se depositan en un recipiente especial (Nalgene TM 1°C Freezing Container), que contiene alcohol isopropílico*. Se coloca el recipiente en un congelador a -40°C durante una noche, para que la temperatura vaya descendiendo gradualmente 1°C/min. Al día siguiente, se pasan los viales a un contenedor de nitrógeno líquido (-70°C). Para ello se disponen los viales en la parte superior de los racks. Al cabo de 12 h se traspasan a la fase líquida (-196°C), donde quedan almacenados.

*Se debe cambiar el alcohol isopropílico después de utilizarlo 5 veces.

c.- Descongelación y prueba de supervivencia

La viabilidad de la cepa congelada se controla por descongelación de uno de los viales. Esta prueba se efectúa normalmente a la semana de haber efectuado la congelación y antes de eliminar los tubos de NNN.

La descongelación debe efectuarse de forma muy rápida. Para ello se sumerge el vial en un baño maria a 40°C, únicamente durante el tiempo necesario para su descongelación. La agitación manual acelera su descongelación.

Se resiembró el contenido del vial en 2 tubos con NNN (0,5 ml/tubo), reservando una parte para proceder a su visualización al microscopio con objeto de observar la movilidad de los parásitos, que se colocan en estufa a 24°C.

Se examinan los cultivos al microscopio al cabo de unos días. Si la siembra es positiva se pueden eliminar los tubos a partir de los cuales se ha efectuado la congelación. Si es negativa debe volverse a empezar a partir del tubo guardado.

ANEXO 3.- PROTOCOLO DEL CULTIVO EN MASA

a.- Medio de cultivo: medio corazón-cerebro-sangre (CCS)

Composición:

- Brain Heart infusión agar (Difco) 52 g
- Agua destilada1000 ml
- Sangre de conejo.10%

Preparación:

-*Agar*: Es semejante al método de preparación del medio NNN (Anexo 2). La solución se distribuye en erlenmeyers de 100 ml (25-30 ml/erlenmeyer) y en frascos de Roux de 1 L (100 ml/frasco).

- *Sangre de conejo*: Ver Anexo 2

- *Mezcla de la sangre con el agar*: Se efectúa de igual forma que para el medio NNN. Los erlenmeyers se dejan en posición vertical y los frascos de Roux en posición horizontal, para que se enfríe y se solidifique el medio.

La ausencia de líquido de exudación obliga a añadir fase líquida a los recipientes: 10 ml para los erlenmeyers y 30 ml para los frascos de Roux, de solución salina estéril al 0,9%. La conservación del medio puede prolongarse durante 1 mes a +4°C.

b.- Obtención del cultivo en masa

La cepa MHOM/FR/78/LEM-75 se siembra en medio NNN en tubos y se hacen 1 ó 2 resiembras. La fase líquida de 3 tubos de NNN de la última resiembra se pasan a 1 erlenmeyer (CCS). Después de incubación en estufa a 24°C, durante 5-7 días, la fase líquida se transfiere a 2 frascos de Roux (CCS). A partir de los promastigotes en fase exponencial de crecimiento (5°-7° días) se prepara el antígeno.

ANEXO 4: REACTIVOS**- PBS: Tampón fosfato**

(Na ₂ HPO ₄) 2 . H ₂ O	14 g
NaH ₂ PO ₄	1,5 g
NaCl	42,5 g
H ₂ 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 ₂ O destilada c.s.p.	1 l

Ajustar a pH: 7,6 con 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%: solución Tris-salino leche 1%

Leche descremada (Régilait 0,8% materia grasa) al 1% en Tris-salino-tween.

- TS 500 mM

Tris (hidroximetil) aminometano	2,4 g
NaCl	29,2 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1 l

Ajustar a pH: 7,6 con HCl concentrado

- Solución metanol/cloronaftol

4 cloro-1-naftol (Merck)	60 mg
Metanol anhidro	20 ml

Conservar en frasco color topacio a 4°C

- Substrato

Solución metanol/cloronaftol	2 ml
TS 500 mM.	8 ml
H ₂ O ₂ al 30%.	4 µl

- Líquido de Hoyer

Agua destilada	50 ml
Goma arábica*	30 g
Hidrato de cloral	200 ml
Glicerina	20 ml

Mezclar los ingredientes a temperatura ambiente y en el orden indicado, no añadiendo el siguiente producto hasta la total disolución del anterior. Filtrar para eliminar, las porciones de impurezas o maderas, sobre lana de vidrio hasta obtención de un líquido transparente.

*Debe utilizarse goma arábica en polvo, y no cristalina, ya que es la única que se mezcla bien con el agua.

ANEXO 5: OBTENCIÓN DE LA DILUCION 1/100 A PARTIR DE LA SANGRE EMBEBIDA EN PAPEL WHATMAN Nº 3

Fisa (55) calcula que a un halo de 6 mm de diámetro, que es el diámetro estándar que tienen los sacabocados del mercado, le corresponden 5 μ l de sangre absorbida en papel Whatman nº 3. Conociendo el hematocrito del perro, que es aproximadamente de 50% (45 ± 7), deduce que al eluir un disco estándar, que posee 5 μ l de sangre, o sea aproximadamente 2,5 μ l de plasma, en 250 ml de tampón (TST-leche 1%), se consigue fácilmente la dilución mínima de trabajo 1/100.

Los discos de papel así eluidos se dejan durante una hora, en estufa a 37°C, en agitación a 175 r.p.m.