

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudios sobre la infección por *Thelazia callipaeda* en el perro  
y el gato y su vector *Phortica variegata* en España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Valentina Marino**

Directoras

**Guadalupe Miró Corrales**  
**Rosa Gálvez Esteban**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Sanidad Animal



**TESIS DOCTORAL**

Estudios sobre la infección por *Thelazia callipaeda* en el perro y el gato y su vector *Phortica variegata* en España.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA  
PRESENTADA POR  
Valentina Marino

Directoras  
Guadalupe Miró Corrales  
Rosa Gálvez Esteban

Madrid, 2021

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Sanidad Animal



**TESIS DOCTORAL**

Estudios sobre la infección por *Thelazia callipaeda* en el perro y el gato y su vector *Phortica variegata* en España.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA  
PRESENTADA POR  
Valentina Marino

Directoras  
Guadalupe Miró Corrales  
Rosa Gálvez Esteban

Madrid, 2021





*Ai miei genitori*



*“La medicina cura al hombre, la veterinaria cura a la humanidad”*

Luis Pasteur (1822-1825)

*“I desideri sono spinte per il futuro. Desidera tanto, riceverai molto”*

Maria Savalli e Giuseppe Mistretta (2004)



## ***Agradecimientos***

*Mi ritrovo a scrivere queste righe nel bel mezzo di una pandemia e, sicuramente in questo periodo non mi è mancato il tempo per riflettere e pensare a tutte le cose che mi sono successe durante questi anni, alle persone che si sono incrociate nel mio cammino e tutti gli insegnamenti ricevuti. Quizás suene muy obvio, pero este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda de todas las personas que, de una manera u otra, han aportado su experiencia y conocimiento a lo largo de estos años y que espero saber agradecer como se merecen.*

*En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directoras de tesis, por su paciencia, dedicación, amabilidad, y por acompañarme durante este largo y apasionante camino. Ha sido un verdadero honor teneros a mi lado.*

*Lupe, gracias por todos estos años, por tu cercanía desde el primer momento, por tu confianza, tu ayuda y tu enseñanza. Me has acogido y me has dado la posibilidad de descubrir el mundo de la investigación, llevándome de la mano entre los diferentes parásitos que tanto te apasionan. Gracias por haberme abierto las puertas del mundo laboral y por ser un gran ejemplo a seguir. Además de tu capacidad de transmitir los conocimientos y por la pasión que cada día tienes por el trabajo que desempeñas. Aunque nuestros caminos profesionales se separen, siempre llevaré conmigo todos los momentos y aprendizajes recibidos.*

*Rosa, gracias por permitirme crecer profesional y personalmente. Por tus consejos y tus críticas constructivas, que al principio tanto me costaba aceptar y que con el tiempo he aprendido a valorar y a agradecer. Gracias por tu ayuda incondicional, tu disponibilidad en cada momento, por enseñarme a sintetizar, por los mapas y por haberme prestado el “coche rojo”, sin el cual muchos muestreos no hubieran sido posibles. ¡Él también ha sido sin duda uno de los protagonistas de esta tesis!*

*Gracias a mis compañeras y compañero del laboratorio 126:*

*Ana, gracias por enseñarme, por estar tan disponible, por tener siempre una buena palabra o una solución a todo, por los muestreos, los desayunos en la cafetería y por tantos años de trabajo juntas.*

*Rocío, gracias por tu sensibilidad y por sacar lo bueno de cada situación. En este camino hemos ido de la mano y has sido un punto de referencia.*

*Juliana, gracias por haber sido mi amiga además de una compañera de trabajo maravillosa, creo que más de una vez he tenido la ocasión de expresarte lo mucho que valoro nuestras charlas. Me siento muy afortunada por haberte conocido y sé que siempre nos vamos a tener, aquí o donde sea que la vida nos lleve.*

*Juanpe, incansable compañero de muestreos y congresos, de descansos y de picos de trabajo. Gracias por tu compañerismo y tu disponibilidad. Espero que se te valore siempre porque te lo mereces.*

*Carol, aunque hayamos coincidido solo al final de este recorrido, en poco tiempo has demostrado ser una gran investigadora. Gracias por todos los momentos compartidos: por ayudarme con la ventana de Lupe, los "viajes" al almacén y por tener la capacidad de explicar la genética de una forma comprensible al resto del mundo.*

*Sonia, tu amabilidad, simpatía y buena disposición hacen que cualquier problema se resuelva con una sonrisa. ¡Gracias por tu alegría y tu sabiduría!*

*Aurora, ejemplo de que en la vida nunca hay que parar de aprender. Gracias por tu valor y por tus mensajes de cariño.*

*Leti e Isa, con las que tuve la suerte de coincidir a lo largo de estos años y de cada una conservo un recuerdo especial.*

*Quiero mencionar a los alumnos y las alumnas que han pasado por el laboratorio 126 y agradecer toda la ayuda que me han ofrecido en el procesado de las muestras y en los muestreos: Sonia, Helena, Miguel Ángel, Sarita, Laura "rubia", Elena, Caturl, Laura "Giardia", Maria, Pablo, Mariama... y muchos más. ¡Ad meliora et maiora semper!*

*Gracias al personal del Departamento de Sanidad Animal, ha sido un placer trabajar con vosotros, y en especial a los grupos de las profesoras Sonia Olmeda y Arantxa Meana: a Félix, a Julia, a JuanDa, a María, a Almudena, a Marta. Gracias por tener siempre una sonrisa por estos pasillos. ¡Y como no, a Miguel y a Edu!*

*A Reyes, siempre atenta y disponible. A Iván, con su sonrisa y su capacidad de tener siempre una buena palabra para alegrar el día. A Vicente, incansable trabajador y ejemplo de profesionalidad, dedicación y compromiso.*

*Gracias al personal del Hospital Clínico Veterinario y en especial a Cristina Rupérez, que ha sido mi mentora en la consulta durante mi primer año en este departamento.*

*A Ricardo García Mata, del Centro de Cálculo de la UCM, gracias por los análisis estadísticos y por tener tanta paciencia a la hora de explicarme las fórmulas.*

*A Carmen Muñoz Serrano y a M<sup>a</sup> del Mar Sanz Luengo, de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, por la ayuda con las búsquedas bibliográficas, los cursos organizados que han sido vitales para organizar la bibliografía de los artículos y de esta tesis y por tener tanta paciencia con todos los artículos en chino, coreano y ruso que os he pedido en los últimos meses.*

*A Abi, de los Servicios Informáticos de la UCM, por ayudarme a solucionar algunos problemas técnicos y por haberme ofrecido las herramientas para que este ordenador pudiese acompañarme en esta etapa.*

*Un grazie speciale va anche al Dipartimento di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari per avermi accolta a braccia aperte all'inizio di questo mio percorso.*

*Grazie al Professor Domenico Otranto, padre indiscusso di Thelazia callipaeda in Europa: è stato un onore poter imparare dal migliore! Grazie al Professor Riccardo Lia per avermi accompagnato nelle uscite al campo, avermi insegnato le tecniche di laboratorio e avermi trasmesso la sua passione per le "burratine". Spero di poter finalmente accettare il suo invito e di tornare a trovarvi presto! Grazie anche a Vito e ad Alfonsa, mi avete fatta sentire a casa!*

*Asimismo, quiero agradecer el personal del Instituto de Higiene y Medicina Tropical de Lisboa para haberme acogido durante mi estancia, a pesar de la pandemia. Muchísimas gracias Carla Maia por abrirme las puertas de tus laboratorios y Andre por compartir conmigo tus cultivos y tus ensayos. He aprendido mucho gracias a vosotros. ¡Muito obrigada!*

*Muchas gracias también a la Profesora Ana María López Beceiro y al Profesor Luis Eusebio Fidalgo por iniciarme en el mundo de la fauna silvestre.*

*Un agradecimiento especial también lo merecen todos los dueños de las mascotas que se han incluido en los diferentes estudios y, por supuesto, ¡las mascotas! Gracias a Dani, a Manuel, a Amparo y a Emiliano de Madrigal de La Vera por habernos abierto las puertas de su casa y habernos dejado tratar a sus increíbles perritos.*

*Gracias a Mara, Jesús, Eugenio, Víctor y todos los que han participado en el municipio de San Lorenzo del Escorial, junto a la colaboración de Inés y Clara de la Clínica Veterinaria La Plaza.*

*Gracias a Carmen de la Clínica Veterinaria La Cruz Verde, por su ayuda en la inclusión de los casos, al oftalmólogo Mauro Hernández por la clasificación clínica de la enfermedad y a todas las clínicas a lo largo de la geografía española que han contribuido en este trabajo.*

*Igualmente debo agradecer a las compañías farmacéuticas Bayer Animal Health y Elanco Animal Health por haber proporcionado los tratamientos para la realización de los estudios terapéuticos y profilácticos descritos en este trabajo.*

*Y ahora, aunque menos relacionado con mi desarrollo profesional, pero absolutamente claves para el personal, quiero agradecer a mi familia: grazie per esserci sempre stati, per avermi sostenuto e appoggiato così lontani, ma allo stesso tempo, così vicini. Non sarei mai arrivata a questo punto se non grazie al vostro aiuto psicologico ed economico e, soprattutto, al vostro amore incondizionato. Mamma, con la tua forza mi hai sempre spronata, fin da bambina, a migliorare e a non arrendermi di fronte alle difficoltà e papà, tu con la tua costanza e la tua pazienza mi hai trasmesso che a volte non c'è bisogno di grandi parole, ma che i gesti possono valere molto di più. Ed è a voi che ho voluto dedicare questo lavoro, ve lo meritate, grazie di vero cuore!*

*Alessandra, entrambe sappiamo che ci unisce, ci ha unito e ci unirà sempre un affetto incondizionato. Alcune delle scelte che ho fatto nella mia vita sono state grazie ai tuoi consigli e non posso pensare a nessuno più determinato di te nell'inseguire un sogno, sei stata un esempio!*

*Quiero dar las gracias también a mi familia española: a Lola, a José Luis, a Nuria, a Abraham y a Mario, por haberme hecho siempre sentir una más, por vuestro cariño sincero, por las clases de fotografía, por los dibujos, por la portada de esta tesis y por los “tupper” que he agradecido en más de una ocasión.*

*Voglio ringraziare i miei nonni, Giuseppe e Maria, che mi hanno trasmesso, tra tante altre cose, la passione per la cultura e la curiosità per scoprire le meraviglie di questo mondo.*

*Le mie amiche e i miei amici, quelli che ci sono sempre stati e quelli nuovi: Silvia, Paolo, Emma, Eleonora, Gaia, Giuseppe... siete il mio passato, il mio presente e il mio futuro. Abbiamo vissuto tantissimi momenti insieme e sono orgogliosa e mi sento molto fortunata di avervi nella mia vita.*

*Laura, Soraya, Lili, Patri, Berta, Claudia, Cristina, Elena, Ángela gracias por nuestras charlas, por los ánimos y por las risas.*

*A todas mis mascotas, que han despertado en mí el amor por los animales desde que era niña: a Luna, a Cherie, a Pelé, a Zeus, a Merlín, a Pigo, a Acho ¡y a muchos más!*

*Y tú, pulcino. Gracias por ser mi familia en un país donde no tengo la mía. Gracias por creer en mí, más de lo que yo misma a veces era capaz de hacer. Por ser mi mejor amigo y aconsejarme, apoyarme y quererme durante este tiempo. ¡Este trabajo también es gracias a ti!*



# ÍNDICE

	<u>PÁG.</u>
TABLA DE EQUIVALENCIAS .....	V
LISTADO DE FIGURAS .....	VII
LISTADO DE TABLAS .....	IX
RESUMEN .....	XI
SUMMARY .....	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
2.1. THELAZIOSIS CANINA Y FELINA .....	9
2.1.1. <i>Thelazia callipaeda</i> .....	9
2.1.1.1. Taxonomía.....	9
2.1.1.2. <i>Thelazia</i> spp.....	10
2.1.1.3. Morfología.....	12
2.1.1.4. Biología.....	16
2.1.2. <i>Phortica variegata</i> .....	21
2.1.2.1. Taxonomía.....	21
2.1.2.2. <i>Phortica</i> spp. ....	22
2.1.2.3. Morfología.....	23
2.1.2.4. Metodos de captura.....	27
2.1.2.5. Biología.....	29
2.1.2.6. Fenología.....	34
2.1.2.7. Distribución geográfica.....	35
2.2. EPIDEMIOLOGÍA .....	39
2.2.1. <i>Desarrollo histórico: antecedentes</i> .....	39
2.2.2. <i>Importancia mundial de la infección por Thelazia callipaeda</i> .....	40
2.2.3. <i>Expansión geográfica de la thelaziosis canina en Europa</i> .....	41
2.2.3.1. <i>Análisis de la emergencia de la infección por Thelazia callipaeda en España</i> ..	47
2.2.4. <i>Expansión geográfica de la thelaziosis felina en Europa</i> .....	48
2.2.5. <i>Reservorios</i> .....	50
2.2.6. <i>Factores de riesgo</i> .....	54
2.2.7. <i>Impacto en Salud Pública</i> .....	55
2.3. PATOGENIA .....	61
2.4. CUADRO CLÍNICO .....	62
2.5. DIAGNÓSTICO.....	67

2.5.1. Diagnóstico clínico .....	67
2.5.1.1. Inspección ocular .....	68
2.5.2. Diagnóstico epidemiológico .....	68
2.5.3. Diagnóstico parasitológico .....	69
2.5.3.1. Observación microscópica directa .....	69
2.5.3.2. Diagnóstico molecular .....	70
2.5.4. Diagnóstico diferencial .....	71
2.6. CONTROL .....	73
2.6.1. Tratamiento .....	74
2.6.1.1. Extracción manual .....	74
2.6.1.2. Principios activos .....	74
2.6.1.3. Tipos de presentación .....	82
2.6.1.4. Tratamientos complementarios .....	84
2.6.2. Profilaxis .....	84
2.6.2.1. Principios activos .....	85
2.6.2.2. Lucha antivectorial .....	88
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>93</b>
A. RELACIONADOS CON EL VECTOR: .....	94
i. Estudiar el papel vectorial de <i>Phortica variegata</i> en España. ....	94
ii. Determinar la presencia y abundancia de <i>Phortica variegata</i> en los focos autóctonos detectados de infección por <i>Thelazia callipaeda</i> . ....	94
iii. Determinar las variables ambientales que influyen sobre la abundancia de <i>Phortica variegata</i> y su dinámica estacional. ....	94
B. RELACIONADOS CON EL HOSPEDADOR: .....	95
i. Determinar la prevalencia actual de la thelaziosis canina y felina en áreas endémicas de España. ....	955
ii. Determinar los factores de riesgo que influyen sobre la infección por <i>Thelazia callipaeda</i> en el perro y el gato. ....	955
iii. Diseñar una clasificación clínica de los pacientes con thelaziosis canina y felina. ...	95
iv. Desarrollar mapas actualizados de la distribución geográfica de los casos de thelaziosis canina y felina en España, desde su primera denuncia hasta la actualidad. ...	95
v. Evaluar y comparar la eficacia terapéutica y profiláctica de diferentes formulaciones utilizadas en perros y en gatos frente a la infección por <i>Thelazia callipaeda</i> . ....	955
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>99</b>

4.1. ÁREA DE ESTUDIO .....	99
4.2. EXAMEN CLÍNICO DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN LOS DIFERENTES ESTUDIOS .....	102
4.3. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>THELAZIA</i> SPP. ....	105
4.4. ANÁLISIS ESPACIAL DE LOS CASOS DE INFECCIÓN POR <i>THELAZIA CALLIPAEDA</i> EN ESPAÑA .....	106
4.5. CAPTURA, IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS ESPECÍMENES DE <i>PHORTICA</i> SPP. ....	106
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	110
<b>5. RESULTADOS: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS .....</b>	<b>113</b>
5.1. DETECTION OF <i>THELAZIA CALLIPAEDA</i> IN <i>PHORTICA VARIEGATA</i> AND SPREAD OF CANINE THELAZIOSIS TO NEW AREAS IN SPAIN.....	113
5.2. TEMPERATURE IS A COMMON CLIMATIC DESCRIPTOR OF LACHRYPHAGOUS ACTIVITY PERIOD IN <i>PHORTICA VARIEGATA</i> (DIPTERA: DROSOPHILIDAE) FROM MULTIPLE GEOGRAPHICAL LOCATIONS .....	127
5.3. SPAIN AS A DISPERSION MODEL FOR <i>THELAZIA CALLIPAEDA</i> EYEWORM IN DOGS IN EUROPE .....	141
5.4. UPDATE ON THE TREATMENT AND YEAR-ROUND PREVENTION OF THELAZIOSIS ( <i>THELAZIA CALLIPAEDA</i> ) IN NATURALLY INFECTED DOGS FROM SPAIN .....	155
5.5. FELINE THELAZIOSIS ( <i>THELAZIA CALLIPAEDA</i> ) IN SPAIN: STATE-OF-THE-ART AND FIRST PROPHYLACTIC TRIAL IN CATS .....	169
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>187</b>
6.1. FENOLOGÍA DE <i>PHORTICA VARIEGATA</i> .....	187
6.1.1. <i>Phortica variegata</i> como vector intermediario de <i>Thelazia callipaeda</i> .....	187
6.1.2. Características climáticas y ecológicas que determinan la presencia de <i>Phortica variegata</i> .....	190
6.1.2.1. Variables climáticas .....	191
6.1.2.2. Variables ecológicas .....	194
6.2. ESTUDIOS SOBRE LA DISPERSIÓN DE LA THELAZIOSIS CANINA Y FELINA EN ESPAÑA ...	195
6.2.1. <i>Thelaziosis canina y felina en España como modelo de difusión en Europa</i> .....	195
6.2.2. <i>Estudios sobre la prevalencia de la infección por <i>Thelazia callipaeda</i> en el perro y en el gato</i> .....	202
6.2.2.1. Variables epidemiológicas analizadas en el perro y en el gato.....	205
6.2.3. <i>Papel que desempeñan los perros y los gatos en la epidemiología de la infección por <i>Thelazia callipaeda</i></i> .....	207
6.3. MEDIDAS TERAPÉUTICAS Y PROFILÁCTICAS DE LA THELAZIOSIS CANINA Y FELINA .....	209

6.3.1. Clasificación clínica de la thelaziosis canina y felina .....	209
6.3.2. Tratamiento y prevención de la thelaziosis canina.....	210
6.3.2.1. Eficacia terapéutica.....	210
6.3.2.2. Eficacia profiláctica .....	213
6.3.3. Tratamiento y prevención de la thelaziosis felina .....	214
6.3.3.1. Eficacia terapéutica.....	215
6.3.3.2. Eficacia profiláctica .....	216
6.3.3. Consideraciones generales sobre el tratamiento y la prevención de la thelaziosis canina y felina.....	217
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>221</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>227</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>253</b>

## **Tabla de equivalencias**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AEMET:** Agencia Estatal de Meteorología

**AEMPS:** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

**°C:** Grados centígrados

**ca.:** Aproximadamente

**cm:** Centímetros

**Cox1:** Ciclooxygenasa-1

**CVBD:** *Canine Vector Borne Diseases*

**Dpto.:** Departamento

**EE. UU.:** Estados Unidos

**EMA:** Agencia Europea de Medicamentos

**etc.:** etcétera

**GARP:** *Genetic Algorithm for Rule Production*

**h:** Hora

**HIE:** *Helminth infecting eyes*

**HR:** Humedad relativa

**IPCC:** *Intergovernmental Panel on Climate Change*

**JCR:** *Journal Citation Reports*

**kg:** Kilogramos

**km:** Kilómetros

**L1:** Larva 1

**m:** Metros

**mg:** Miligramos

**ml:** Mililitros

**mm:** Milímetros

**m s.n.m.:** Metros Sobre el Nivel del Mar

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*

**µg:** microgramo

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**pb:** pares de bases

**p. ej.:** Por ejemplo

**p.i.:** Post-infección

**p.v.:** peso vivo

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**s.c.:** Subcutánea

**T<sup>a</sup>:** Temperatura

**UCM:** Universidad Complutense de Madrid

**VBH:** *Vector-Borne Helminth*

**VBND:** *Vector-Borne Neglected Disease*

**v.o.:** vía oral

**WHO:** World Health Organization

## Listado de figuras

	<u>PÁG.</u>
<b>Figura 1.</b> Micrografía óptica de una hembra de <i>Thelazia callipaeda</i> aclarada con solución de Amman .....	12
<b>Figura 2.</b> Micrografía óptica de una L1 de <i>Thelazia callipaeda</i> , donde se evidencia la membrana del huevo .....	13
<b>Figura 3.</b> Adultos de <i>Thelazia callipaeda</i> .....	14
<b>Figura 4.</b> Micrografía óptica con el detalle de la extremidad cefálica, la cutícula estriada (CE) y la capsula bucal (CB) de un ejemplar adulto de <i>Thelazia callipaeda</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> Número de estrías transversales de la cutícula en función de la porción del cuerpo .....	15
<b>Figura 6.</b> Detalle del extremo caudal de un macho de <i>Thelazia callipaeda</i> .....	15
<b>Figura 7.</b> Micrografía óptica de la extremidad cefalica de una hembra de <i>Thelazia callipaeda</i> aclarada con solución de Amman.....	16
<b>Figura 8.</b> Ciclo biológico de <i>Thelazia callipaeda</i> .....	17
<b>Figura 9.</b> Micrografía óptica de varias L1 de <i>Thelazia callipaeda</i> en las secreciones lacrimales de un perro. ....	18
<b>Figura 10.</b> Asociación entre <i>Thelazia callipaeda</i> y el macho de <i>Phortica variegata</i> ....	19
<b>Figura 11.</b> Huevo de <i>Phortica variegata</i> depositado en un sustrato de manzana .....	23
<b>Figura 12.</b> Primer estadio larvario de <i>Phortica variegata</i> alimentándose de un trozo de manzana (ciclo experimental).....	24
<b>Figura 13.</b> Detalles morfológicos de la pupa de <i>Phortica variegata</i> obtenida en condiciones de laboratorio.....	24
<b>Figura 14.</b> Características morfológicas de una hembra y un macho de <i>Phortica variegata</i> .....	26
<b>Figura 15.</b> Representación esquemática de una trampa de captura de drosófilas .....	28
<b>Figura 16.</b> Adultos de <i>Phortica variegata</i> alimentándose. ....	33

<b>Figura 17.</b> Modelos elaborados para valorar la distribución geográfica de <i>Phortica variegata</i> en Europa.....	38
<b>Figura 18.</b> Distribución geográfica de <i>Thelazia callipaeda</i> en Europa y Asia.....	42
<b>Figura 19.</b> Infección por vermes adultos de <i>Thelazia callipaeda</i> en mamíferos silvestres .....	52
<b>Figura 20.</b> Distribución geográfica de los casos de thelaziosis humana en China .....	57
<b>Figura 21.</b> Ojo derecho de un niño de 3 años infectado con vermes adultos de <i>Thelazia callipaeda</i> .....	59
<b>Figura 22.</b> Perro con infección masiva por <i>Thelazia callipaeda</i> asociada a alopecia periorbital y conjuntivitis .....	62
<b>Figura 23.</b> Infección subclínica por <i>Thelazia callipaeda</i> en un perro .....	63
<b>Figura 24.</b> Signos clínicos en perros con infección por <i>Thelazia callipaeda</i> .....	66
<b>Figura 25.</b> Blefaritis y úlcera en la conjuntiva superior en un gato con infección por <i>Thelazia callipaeda</i> .....	667
<b>Figura 26.</b> Zona 1 de muestreo en la localidad de Madrigal de la Vera (Cáceres), caracterizada por la presencia de robles.....	100
<b>Figura 27.</b> Localización geográfica de las cuatro zonas de muestreo.....	1022
<b>Figura 28.</b> Recogida y almacenamiento de los especímenes de <i>Thelazia callipaeda</i>	1033
<b>Figura 29.</b> Método de captura de ejemplares de <i>Phortica variegata</i> .....	107
<b>Figura 30.</b> Termohigrómetro (PCE-MHT 1, PCE Instruments, Southampton, Reino Unido) utilizado para la medición de la temperatura y la humedad relativa.....	108
<b>Figura 31.</b> Macho y hembra de <i>Phortica variegata</i> observados al estereomicroscopio. ....	109

## Listado de tablas

	<u>PÁG.</u>
<b>Tabla I.</b> Clasificación taxonómica de <i>Thelazia callipaeda</i> .....	10
<b>Tabla II.</b> Especies de <i>Thelazia</i> , hospedadores, vectores y distribución geográfica.....	11
<b>Tabla III.</b> Características morfológicas y longitud (mm) de los diferentes estadios de desarrollo de <i>Thelazia callipaeda</i> .....	13
<b>Tabla IV.</b> Clasificación taxonómica de <i>Phortica variegata</i> .....	21
<b>Tabla V.</b> Especies del género <i>Phortica</i> spp. que se han descrito en Europa.....	22
<b>Tabla VI.</b> Número, sexo, relación macho/hembra (M/H) de especímenes de <i>Phortica variegata</i> recolectadas cada mes, junto con la temperatura (T <sup>a</sup> expresada en °C) y la humedad relativa (HR expresada en porcentaje) registradas en el sitio de captura.....	30
<b>Tabla VII.</b> Casos de thelaziosis y prevalencias de la infección por <i>Thelazia callipaeda</i> publicados hasta la fecha en los diferentes países de Europa y en las diferentes especies .....	45
<b>Tabla VIII.</b> Signos clínicos descritos en perros y gatos con infección por <i>Thelazia callipaeda</i> .....	64
<b>Tabla IX.</b> Principales principios activos empleados en el tratamiento de la thelaziosis canina y felina.....	76
<b>Tabla X.</b> Principios activos empleados en la prevención de la thelaziosis canina .....	86
<b>Tabla XI.</b> Clasificación clínica de la thelaziosis canina.....	104
<b>Tabla XII.</b> Clasificación clínica de la thelaziosis felina .....	105
<b>Tabla XIII.</b> Estudios sobre la prevalencia de la infección por <i>Thelazia callipaeda</i> en perros y gatos (G) realizados en España. ....	203



## Resumen

*Thelazia callipaeda* es un nematodo responsable de infecciones oculares en una amplia variedad de mamíferos. En Europa el vector competente es una mosca drosófila no picadora, *Phortica variegata*, que transmite la infección al alimentarse de las secreciones oculares de los hospedadores. La infección por *T. callipaeda* se considera una zoonosis emergente debido al aumento, en muy pocos años, del número de casos en animales y personas.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido diseñar investigaciones encaminadas a profundizar en el conocimiento de esta parasitosis emergente en el perro y el gato, y de su vector.

Para investigar el **papel vectorial** de *P. variegata* en la transmisión de *T. callipaeda* en condiciones naturales, se realizaron muestreos entomológicos en tres zonas geográficas de España. Las moscas capturadas fueron identificadas y diseccionadas para valorar la presencia de larvas de tercer estadio (L3) de *T. callipaeda*. Mediante disección, se detectaron dos L3 de *T. callipaeda*, en la proboscis de dos moscas. Además, se procedió al análisis molecular de 371 especímenes procedentes de La Vera, Cáceres, detectando ADN de *T. callipaeda* en 28 (7,5%).

Para estudiar la **dinámica estacional** de *P. variegata* y determinar su abundancia, se realizaron muestreos periódicos en tres focos autóctonos de España registrando datos sobre la temperatura y la humedad relativa. Asimismo, se realizó un estudio multicéntrico basado en un muestreo entomológico coordinado entre varios grupos de investigación y realizado en cinco puntos de cuatro países diferentes (España, Italia, Reino Unido y Estados Unidos). En el primer estudio a nivel nacional, se recolectaron un total de 2.162 ejemplares de *Phortica* spp., mientras en el segundo se recolectaron 4.873 especímenes de *Phortica* spp. Tanto en el estudio a nivel nacional, como en el estudio multicéntrico internacional, el porcentaje total de los machos recolectados fue significativamente mayor que el de las hembras, observándose una correlación positiva significativa entre la densidad de machos de *P. variegata* y la temperatura.

Para investigar la **epidemiología** de la infección por *T. callipaeda* en perros y gatos en España, se llevaron a cabo dos estudios en perros y uno en gatos. En un primer estudio, se examinaron un total de 287 perros en tres sitios de muestreo (La Vera, El Escorial y Miraflores de la Sierra), y se registraron prevalencias del 68, 26 y 33%, respectivamente. En un segundo estudio, se analizaron las prevalencias de la infección por *T. callipaeda* en dos de los sitios muestreados anteriormente (El Escorial y La Vera), en los que los resultados obtenidos coincidieron con los anteriores (30 y 61%, respectivamente). Además, se diseñó una clasificación clínica de los principales signos oculares en perros con infección por *T. callipaeda*. Adicionalmente se realizó una detección activa de casos de thelaziosis canina en clínicas veterinarias de España durante el periodo comprendido entre 2010 y 2018. El análisis de esta información condujo al desarrollo de un mapa patrón de modelo de dispersión de esta parasitosis. Por otro lado, en el estudio realizado en la población felina, se examinaron un total de 74 gatos en dos sitios de muestreo, y se registraron prevalencias del 3,7% y del 40% (en Orense y La Vera, respectivamente). Igualmente, se georreferenciaron los casos clínicos detectados en el periodo comprendido entre 2010 y 2020 desarrollando un mapa de distribución de los casos y se diseñó también una clasificación clínica de los principales signos oculares en gatos con thelaziosis.

Para profundizar en las medidas de **control** de la thelaziosis canina y felina, se realizaron dos ensayos, uno en perros y otro en gatos. Se comparó la eficacia terapéutica y profiláctica de cuatro moléculas diferentes (dos a base de moxidectina, una de milbemicina y otra de ivermectina) para el control de la thelaziosis canina en tres zonas endémicas. Los resultados obtenidos mostraron una eficacia del 70,4% al 100%, según el principio activo. La eficacia profiláctica obtenida fue de entre un 83% y un 100%. En cuanto a la especie felina, se reclutaron dos poblaciones de gatos con thelaziosis para evaluar la eficacia terapéutica de una formulación a base de ivermectina y otra de moxidectina, obteniendo una eficacia terapéutica de entre el 91,7% (ivermectina) y el 100% (moxidectina). Por último, el uso mensual de una formulación de moxidectina también se estudió en un ensayo de profilaxis de un año de duración en el que se demostró la ausencia de reinfección en los gatos tratados.

Esta memoria representa la primera Tesis Doctoral realizada sobre la infección por *T. callipaeda* en el perro y el gato y su vector *P. variegata* en España.

## Summary

*Thelazia callipaeda* is a nematode responsible for eye infections in a wide range of mammals. In Europe, the competent vector is a non-biting drosophila fly, *Phortica variegata*, which transmits the parasite by feeding on the host ocular secretions. Thelaziosis is considered an emerging zoonosis due to the increase in the number of cases in animals and people in recent years.

The main objective of this Doctoral Thesis was to design studies to broaden the knowledge of the vector of this emerging parasitosis, and its impact on the health of dogs and cats.

Entomological samplings were carried out in three geographical areas of Spain to investigate the role of *P. variegata* as a **vector** in the transmission of *T. callipaeda* under natural conditions. Flies were captured, identified, and dissected to assess the presence of third-stage larvae (L3) of *T. callipaeda*. By dissection, two L3 of *T. callipaeda* were detected in the proboscis of two flies. In addition, 371 specimens from La Vera, Caceres, were analysed by molecular techniques, detecting *T. callipaeda* DNA in 28 of them (7.5%).

Periodic samplings were carried out in three autochthonous foci of Spain. Data on temperature and relative humidity were recorded to study the **seasonal dynamics** of *P. variegata* and determine its abundance. Likewise, a further multicenter study based on entomological sampling was coordinated by multiple research groups and carried out in five different locations in four countries (Spain, Italy, United Kingdom, and the United States). In the first national-level study, 2,162 specimens of *Phortica spp.* were collected, while 4,873 in the second multicenter trial. In both studies, the total percentage of male flies collected was significantly higher than the female's one, observing a significantly positive correlation between the density of *P. variegata* males and the temperature.

Three studies were carried out (two in dogs and one in cats) to investigate the **epidemiology** of *T. callipaeda* infection in dogs and cats in Spain. In the first study, 287

dogs from three sampling sites (La Vera, El Escorial, and Miraflores de la Sierra) underwent a clinical examination to detect the presence of *T. callipaeda*. Prevalences for each site were 68, 26 and 33%, respectively. In the second study, the prevalences of *T. callipaeda* infection in two of the sites (El Escorial and La Vera) were recorded and compared to previous studies, showing similar prevalences (30 and 61%, respectively). In addition, a clinical staging of the main ocular signs observed in dogs with *T. callipaeda* infection was also designed. Additionally, clinical cases of canine thelaziosis from veterinary practices in Spain were confirmed and recorded from 2010 and 2018. The analysis of this information allowed mapping the dispersion of this parasitosis. Regarding the study carried out in the feline population, a total of 74 cats were examined in two sampling sites, with prevalences of 3.7% and 40% detected in Orense and La Vera, respectively. Similarly, a clinical staging of ocular signs in cats with thelaziosis was designed, and clinical cases from 2010 and 2020 were georeferenced to map the distribution of feline cases in Spain.

Two trials were conducted, one in dogs and one in cats, to evaluate current **control** measures of canine and feline thelaziosis. The therapeutic and prophylactic efficacy of four different anti-parasite formulations (two based on moxidectin, milbemycin, and ivermectin) was assessed in three endemic areas. Treatment efficiency ranged from 70.4% to 100%, according to the active ingredient. Year-round prophylactic efficacy varied between 83% and 100%.

Regarding feline species, two populations of cats with thelaziosis were recruited to evaluate the therapeutic efficacy of a formulation of ivermectin and another of moxidectin. Treatment efficacy ranged from 91.7% (ivermectin) to 100% (moxidectin). Lastly, the monthly use of a moxidectin formulation was also evaluated in a one-year prophylaxis trial, showing it prevented reinfections in all cats included in the study.

The present manuscript is the first Doctoral Thesis addressing *T. callipaeda* infection in dogs and cats, and its vector *P. variegata* in Spain.

# 1. INTRODUCCIÓN

---



# 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de la thelaziosis ha crecido exponencialmente en las últimas décadas debido a su carácter emergente. Esta enfermedad parasitaria está causada por nematodos del género *Thelazia*, que son transmitidos a los seres humanos y a los animales por moscas drosófilas. *Thelazia callipaeda*, Railliet y Henry 1910 (Orden Spirurida, Familia Thelaziidae) es el agente etiológico de la thelaziosis canina y felina. Este nematodo ocular parasita los ojos de una amplia variedad de mamíferos, como los carnívoros domésticos (perros, gatos) y silvestres (lobos, zorros, garduñas, etc.), los lagomorfos (conejos y liebres), e incluso los seres humanos (Yamaguti 1961; Anderson 2000; Shen *et al.* 2006) y se considera en expansión en varios países europeos y asiáticos (Shen *et al.*, 2006; Otranto y Dutto, 2008; Otranto *et al.*, 2010, 2013; Colwell *et al.*, 2011; Tahir *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020).

*T. callipaeda* es un parásito originario de Asia, concretamente de India, donde fue descrito por primera vez por Railliet y Henry en 1910 (Faust, 1928). Poco después, se empezaron a denunciar los primeros casos en la ex Unión Soviética y otros países asiáticos donde, a día de hoy, la thelaziosis está ampliamente distribuida: China (Stuckey, 1917), Indonesia (Kosin *et al.*, 1989), Japón (Koyama *et al.*, 2000), Birmania (Evans y Rennie, 1910), Corea del Sur (Hong *et al.*, 1981) y Tailandia (Bhaibulaya *et al.*, 1970).

En el año 1989 se denunció por primera vez la presencia de *T. callipaeda* (Rossi y Bertaglia, 1989) en Europa, concretamente en Italia. La información disponible en la literatura científica hasta entonces era escasa, fragmentaria y provenía en su totalidad de los países asiáticos mencionados, estando muchas veces escrita en el idioma propio del país de procedencia. Consideramos oportuno destacar el importante papel del Profesor Domenico Otranto (Universidad de Bari, Italia) en la investigación de esta parasitosis en Europa, siendo el primero en denunciar la presencia de casos en nuestro continente y uno de los principales propulsores del estudio del ciclo biológico y de su vector.

Desde la descripción de los primeros casos en Europa, la comunidad científica internacional ha estudiado la dispersión de este parásito, y actualmente ya se han observado casos de thelaziosis en 22 países europeos y al menos en 12 en el continente

asiático. Por todo ello, la thelaziosis se considera una importante enfermedad emergente con impacto tanto en salud animal, como en Salud Pública por su carácter zoonótico.

De las especies de *Thelazia* que se conocen hasta el momento, *T. callipaeda* y *Thelazia californiensis*, Price 1930, tienen interés zoonótico, habiéndose detectado casos en humanos. *T. californiensis* infecta ovejas, ciervos, coyotes y osos, y se localiza en las regiones occidentales de Estados Unidos (Anderson, 2000). En los últimos años se han descrito dos casos de infección en humanos causados por *Thelazia gulosa* Railliet y Henry, 1910 en Estados Unidos (Bonura *et al.*, 2018; Bradbury *et al.*, 2020), convirtiéndose en la tercera especie de *Thelazia* con interés zoonótico.

Uno de los puntos más importantes de la biología de *T. callipaeda* se refiere a las especies de artrópodos que pueden actuar como vectores. La transmisión del parásito se realiza mediante dípteros de la familia Drosophilidae que se alimentan de secreciones oculares de los hospedadores definitivos que contienen los estadios larvarios de este nematodo. En Italia, se ha descrito que, en condiciones naturales, este parásito es transmitido por el macho de una mosca drosófila no picadora, *Phortica variegata* (Orden Diptera, Familia Drosophilidae) (Otranto *et al.*, 2006b). La escasez de información presente en la literatura sobre la dinámica estacional y la biología de *P. variegata* representa un factor limitante para el diseño de estudios sobre las relaciones entre *T. callipaeda* y su vector.

La thelaziosis canina y felina se caracteriza por cuadros subclínicos o bien cursa con conjuntivitis, epífora, queratitis, opacidad y/o úlcera corneal (Otranto y Traversa, 2005). El cuadro clínico se produce como consecuencia del movimiento de estos nematodos que provocan la irritación de la conjuntiva debido su cutícula serrada. Los casos más graves se observan en infecciones crónicas y/o con un número masivo de parásitos. En ocasiones, la presencia de adultos y larvas pueden provocar infecciones bacterianas secundarias que dan lugar a conjuntivitis mucopurulenta. Es importante incluir esta enfermedad en el diagnóstico diferencial de los procesos que cursen con conjuntivitis, así como realizar una exploración oftalmológica exhaustiva en animales con signos compatibles que vivan o hayan viajado a zonas endémicas, fundamentalmente en la época de actividad del artrópodo vector que se extiende de mayo a noviembre (con algunas variaciones según la localización geográfica).

El diagnóstico de la thelaziosis canina y felina debe incluir la realización de una adecuada anamnesis, en la que se revise el historial de viajes del paciente, seguida de la exploración oftalmológica y búsqueda activa de los parásitos en la cavidad ocular. Posteriormente, es necesaria la identificación de los ejemplares de *T. callipaeda* siguiendo las claves de identificación morfológica. Además, con fines de investigación, puede llevarse a cabo la caracterización mediante diagnóstico molecular por PCR del gen *cox1* de este nematodo.

En el momento en el que se detecta un caso de thelaziosis canina o felina, el tratamiento de elección debe incluir la retirada manual (con ayuda de un hisopo estéril o mediante lavado con solución salina fisiológica) y la posterior aplicación de un nematocida ocular (Lia *et al.*, 2004), tópico (Bianciardi y Otranto, 2005; Otranto *et al.*, 2016), oral (Fudge *et al.*, 2007; Motta *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2016) o inyectable (Rossi *et al.*, 2007). Los principios activos, tales como las lactonas macrocíclicas presentan una adecuada eficacia en el tratamiento de la thelaziosis; siendo la moxidectina y la milbemicina oxima las únicas moléculas registradas en Europa para el tratamiento de la thelaziosis canina (Motta *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2016, 2019). La moxidectina ha sido registrada recientemente en la AEMPS (“AEMPS, Advocate,” 2021) con esta indicación también para el tratamiento de la thelaziosis felina. El control de la thelaziosis en zonas endémicas se basa en la aplicación de principios activos con eficacia profiláctica en los animales expuestos para reducir la prevalencia, y disminuir el riesgo de infección en otras especies tanto domésticas como silvestres, así como en las personas. Así mismo, es importante evitar la exposición al vector en las épocas de riesgo mediante el uso de mosquiteras, o evitar paseos por zonas con amplia presencia del mismo. La prevención y el control de esta parasitosis deben centrarse en reducir el riesgo de infección a nivel individual, y en reducir la prevalencia e incidencia de la infección a nivel poblacional.

Como se ha mencionado previamente, la expansión geográfica de la infección por *T. callipaeda* en España y en Europa es reciente. La thelaziosis humana no representa un problema importante de Salud Pública en Europa, pero sí en el continente asiático, y especialmente en China, donde durante los años 1917-2018 se han registrado un total de 653 casos de thelaziosis humana distribuidos en 28 de las 34 provincias, regiones autónomas o municipios de China (S. Wang *et al.*, 2014; X.-L. Wang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020), siendo el país con el mayor número de casos descritos en el mundo.

A pesar de las altas prevalencias de thelaziosis en la especie canina o en otras especies silvestres en algunos países de Europa (Otranto *et al.*, 2003a; Malacrida *et al.*, 2008; Otranto *et al.*, 2009c; Miró *et al.*, 2011; Hodžić *et al.*, 2014; Hadži-Milić *et al.*, 2016; Maia *et al.*, 2016), tan solo se han descrito algunos casos de infección en humanos, probablemente debido a la limitada información en la literatura sobre la thelaziosis humana o la dificultad para diferenciarla de una conjuntivitis bacteriana o alérgica (Otranto y Dutto, 2008) y, por tanto, su importancia podría estar subestimada (Shen *et al.*, 2006). Además, la thelaziosis humana ocurre mayoritariamente en zonas rurales con limitados recursos económicos y afecta principalmente a niños y personas mayores con dificultad de mantener a las moscas alejadas (Shen *et al.*, 2006; X.-L. Wang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020).

Según lo expuesto, se pone de manifiesto que existen importantes lagunas en el conocimiento integral de esta enfermedad. Es por ello que surge la necesidad de plantear estudios de investigación que aborden diferentes objetivos relacionados con la expansión de la infección por *T. callipaeda* en España: la fenología de *P. variegata* y su papel como vector de *T. callipaeda* en condiciones naturales, la difusión de la thelaziosis en la población canina y felina en España y el análisis de la eficacia de diferentes moléculas que mejoren su control.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Thelaziosis canina y felina

La thelaziosis es una infección ocular causada por nematodos pertenecientes al género *Thelazia* Bosc 1819 (Orden Spirurida, Familia Thelaziidae), comúnmente conocidos como “parásitos oculares”, que comprenden una variedad de espirúridos que se localizan en el saco conjuntival y conductos naso-lacrimales de diferentes especies de mamíferos, como cánidos, félidos, rumiantes, équidos, aves y humanos (Yamaguti, 1961; Anderson, 2000).

Se transmite por diferentes especies de moscas que se alimentan de las secreciones lacrimales de los hospedadores definitivos (Skrjabin *et al.*, 1967; Anderson, 2000).

El agente etiológico de la thelaziosis canina y felina, una patología ocular cada vez más frecuente en Europa, es el nematodo *Thelazia callipaeda*, Railliet y Henry, 1910.

#### 2.1.1. *Thelazia callipaeda*

Este nematodo ocular (**Tabla I**) parasita diferentes especies de mamíferos como cánidos (*Canis familiaris*, *Nyctereutes procyonoides*, *Vulpes fulva*, *Vulpes vulpes*, *Canis lupus*), félidos (*Felis catus*, *Felis silvestris*), lagomorfos (*Oryctolagus cuniculus*, *Lepus europaeus*) y humanos (Skrjabin *et al.*, 1967; Anderson, 2000; Shen *et al.*, 2006; Otranto *et al.*, 2007).

*T. callipaeda* se conocía como el “verme oriental del ojo”, debido a que, en un principio, su distribución geográfica se limitaba a países asiáticos (Indonesia, Tailandia, China, Corea, Birmania, India y Japón) y Rusia (Skrjabin, *et al.*, 1967; Anderson, 2000).

##### 2.1.1.1. Taxonomía

La superfamilia Thelazioidea engloba tres familias (Thelaziidae, Rhadochonidae y Pneumospiruridae), que presentan semejanzas en sus estructuras cefálicas, pero notables diferencias en sus requerimientos biológicos (Anderson, 2000). La familia Thelaziidae incluye las subfamilias Thelaziinae y Oxyspirurinae.

La familia Rhabdochonidae incluye la subfamilia Rhabdochona y Trichospirura. La tercera familia es la Pneumospiruridae e incluye los géneros *Pneumospirura*, *MetaThelazia* y *Vogeloides*.

La transmisión y el desarrollo de las especies de estos nematodos ovovivíparos y ovíparos pertenecientes a las primeras dos familias citadas (*Thelazia* y *Oxyspirura* de aves y mamíferos y los rabdochonidos, *Rhabdochona*, de peces y primates) han sido ampliamente descritos en la literatura. En cambio, la transmisión de las especies pertenecientes a la familia Pneumospiruridae se han estudiado poco, y solo se sabe que estos parásitos afectan principalmente a carnívoros (Anderson, 2000).

**Tabla I.** Clasificación taxonómica de *Thelazia callipaeda*. Fuente: Otranto *et al.*, 2020.

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Phylum</b>	Nematoda
<b>Clase</b>	Secernentea
<b>Orden</b>	Spirurida
<b>Familia</b>	Thelaziidae
<b>Subfamilia</b>	Thelaziinae
<b>Género</b>	<i>Thelazia</i>
<b>Especie</b>	<i>callipaeda</i>

#### 2.1.1.2. *Thelazia* spp.

De las especies de *Thelazia* (Yamaguti, 1961; Skrjabin *et al.*, 1967; Anderson, 2000) que se conocen hasta el momento (**Tabla II**), sólo dos son las responsables de la thelaziosis canina y felina: *Thelazia callipaeda* y *Thelazia californiensis* (Price, 1930). Además, la infección causada por estas dos especies y por *T. gulosa* Railliet y Henry, 1910 puede afectar al ser humano (Bonura *et al.*, 2018; Bradbury *et al.*, 2020).

**Tabla II.** Especies de *Thelazia*, hospedadores, vectores y distribución geográfica. Adaptado de Otranto y Traversa (2005).

Especies	Hospedador definitivo	Vector	Distribución geográfica
<i>T. anolabiata</i> **	Aves	Desconocido	Sudamérica
<i>T. brevispiculata</i>	Ganado vacuno	Desconocido	China
<i>T. bubalis</i>	Búfalos	Desconocido	China
<i>T. californiensis</i> *	Perros, gato, rumiantes y humanos	<i>Fannia benjamini</i> , <i>F. canicularis</i> <sup>a</sup>	Norteamérica
<i>T. callipaeda</i> *	Carnívoros domésticos y silvestres, conejos y humanos	<i>Phortica variegata</i> , <i>Amiota okadaï</i> <sup>a</sup> , <i>A. variegata</i> <sup>a</sup>	Asia, Europa, Rusia
<i>T. depressa</i>	Mustélidos	Desconocido	África
<i>T. erschowi</i>	Ganado porcino	Desconocido	Rusia
<i>T. ferulata</i>	Ganado vacuno	Desconocido	China
<i>T. gulosa</i> *	Rumiantes y humanos	<i>Musca amica</i> , <i>M. autumnalis</i> , <i>M. domestica</i> <sup>b</sup> , <i>M. larvípara</i> , <i>M. osiris</i> , <i>M. vitripennis</i>	Asia, Australia, Europa, Norteamérica
<i>T. hsüi</i>	Ganado vacuno	Desconocido	China
<i>T. iheringi</i>	Agutí	Desconocido	Sudamérica
<i>T. kansuensis</i>	Ganado vacuno	Desconocido	China
<i>T. lacrymalis</i> *	Caballos y rumiantes	<i>M. autumnalis</i> <sup>a</sup> , <i>M. osiris</i>	América, Europa
<i>T. leesei</i>	Camellos	<i>M. lucidula</i>	India, Rusia
<i>T. petrowi</i>	Ganado vacuno	Desconocido	Rusia
<i>T. rhodesi</i> *	Rumiantes y caballos	<i>M. autumnalis</i> , <i>M. convexifrons</i> , <i>M. crassirostris</i> ,	África, Asia, América, Europa

		<i>M. domestica</i> <sup>b</sup> , <i>M. hervei</i> <sup>a</sup> , <i>M. larvípara</i> , <i>M. sorbens</i>	
<i>T. skrjabini</i> *	Rumiantes	<i>M. amica</i> , <i>M. autumnalis</i> , <i>M. hervei</i> <sup>a</sup> , <i>M. osiris</i> , <i>M. vitripennis</i> <sup>a</sup>	Asia, Australia, Europa Norteamérica

\*Especies más prevalentes

\*\* (Elias *et al.*, 2008)

<sup>a</sup> En condiciones experimentales.

<sup>b</sup> El papel de *Musca domestica* como hospedador intermediario de *Thelazia gulosa* y *Thelazia rhodesi* es aún controvertido

### 2.1.1.3. Morfología

*Thelazia callipaeda* presenta 5 estadios larvarios antes de alcanzar la forma adulta. Como todos los nematodos, las larvas de primer estadio (L1) se enroscan de forma característica y, como en todos los espirúridos se localizan agrupadas en la porción distal del útero (Otranto *et al.*, 2004) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Micrografía óptica de una hembra de *Thelazia callipaeda* aclarada con solución de Amman. Detalle de varias L1 enroscadas en el interior del útero.

Las L1 presentan una membrana o cubierta externa (restos del huevo embrionado) que es posible distinguir fuera del nematodo (**Fig. 2**).



**Figura 2.** Micrografía óptica de una L1 de *Thelazia callipaeda*, donde se evidencia la membrana del huevo (SM: *shell membrane*). Fuente: Otranto *et al.*, 2003b.

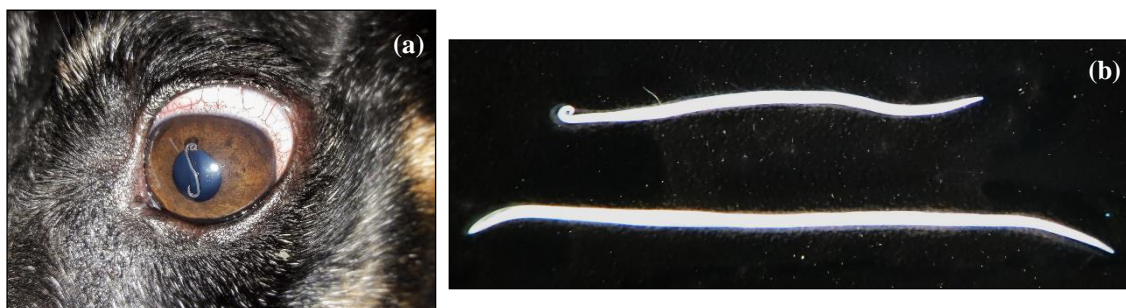
El resto de los estadios larvarios tienen una longitud que aumenta según el estadio evolutivo (**Tabla III**). El detalle de las características de las fases larvarias se verá más en profundidad en el apartado 2.1.1.4. de esta sección.

**Tabla III.** Características morfológicas y longitud (mm) de los diferentes estadios de desarrollo de *Thelazia callipaeda*. Adaptado de Otranto *et al.* (2004).

	L1	L2	L3	L4	L5	Adultos	
						♂	♀
<b>Longitud</b>	0,31–0,4	0,46–3,2	3,2–3,69	3,88–7,66	9–13	9–13	10,45–18
<b>Grosor</b>	0,013–0,046	0,055–0,070	0,12–0,72	0,15–0,25	ND	0,32–0,48	0,41–0,53

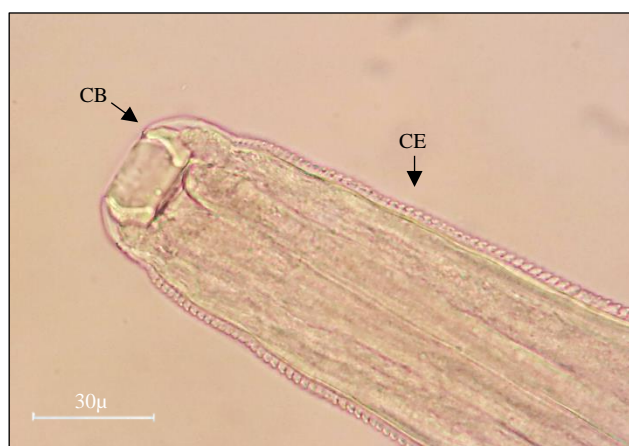
(ND: No descrito)

Los parásitos adultos presentan una coloración blanquecina y tienen aspecto filiforme (Figs. 3a y 3b).



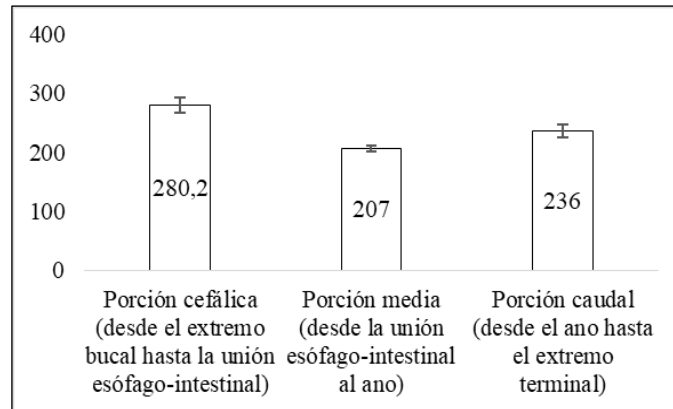
**Figura 3.** Adultos de *Thelazia callipaeda*. **3a.** Infección en un perro. **3b.** Detalle de un macho (arriba) y de una hembra (abajo).

En los estudios de microscopía óptica y electrónica realizados por Otranto *et al.* (2003a), se examinaron 73 ejemplares de *T. callipaeda* por microscopía óptica y 10 por microscopía electrónica. Gracias a estos estudios, se conocen muchas de las características de *T. callipaeda*. La porción cefálica se caracteriza por la ausencia de labios, presentar un esófago filariforme y una cápsula bucal de perfil hexagonal con 6 papilas. Los márgenes internos de la cápsula bucal están evertidos y subdivididos por excavaciones en seis festones (Fig. 4).



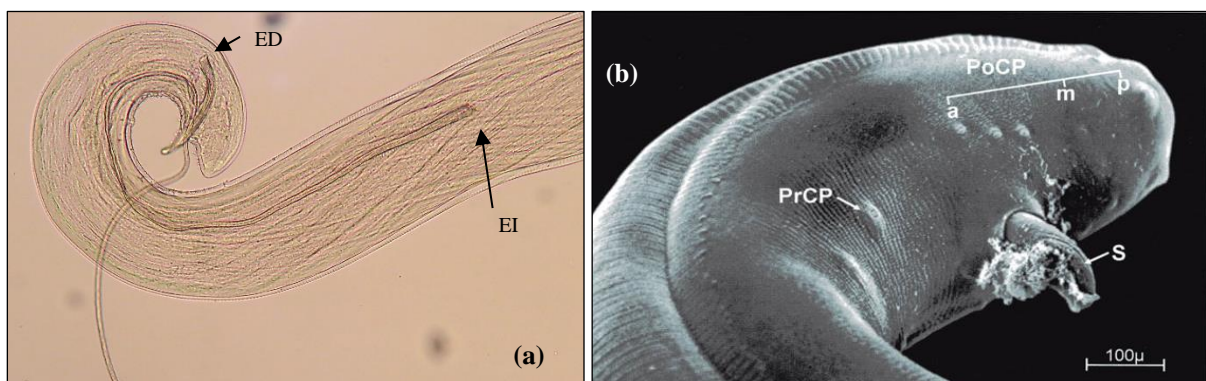
**Figura 4.** Micrografía óptica con el detalle de la extremidad cefálica, la cutícula estriada (CE) y la capsula bucal (CB) de un ejemplar adulto de *Thelazia callipaeda*.

La cutícula presenta estrías transversales, siendo más ondulada en la parte anterior que en la terminación caudal. El número de estrías transversales de la cutícula varía en función de la porción del cuerpo (**Fig. 5**).



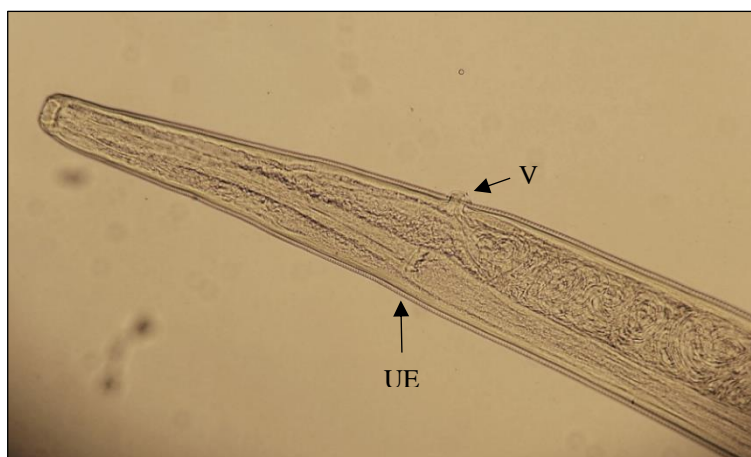
**Figura 5.** Número de estrías transversales de la cutícula en función de la porción del cuerpo. Información extraída de Otranto *et al.*, 2003b.

Los individuos adultos presentan dimorfismo sexual: los machos miden entre 7,7 y 12,8 mm de longitud y 338 y 428  $\mu\text{m}$  de diámetro en la porción media. El esófago mide 650  $\mu\text{m}$  de longitud, los testículos se localizan en la porción media de la cola y la cola es roma y curvada sin presencia de alas caudales (Skrjabin *et al.*, 1967; Bhaibulaya *et al.*, 1970; Otranto *et al.*, 2003b) (**Fig. 6a**). En la superficie ventral de la extremidad caudal, existen 15 pares de papilas, diez de las cuales son pre-cloacales y cinco post-cloacales (**Fig. 6b**) (Otranto *et al.*, 2003b). El número de papilas pre- y post- cloacales sirve para diferenciar especies. Además, los machos presentan dos espículas, siendo la espícula izquierda más larga y, la espícula derecha con forma típica de medialuna (**Fig. 6a**).



**Figura 6.** Detalle del extremo caudal de un macho de *Thelazia callipaeda*. **6a.** Micrografía óptica del macho aclarado con solución de Amman: espícula izquierda (EI), espícula derecha (ED); **6b.** Micrografía electrónica de barrido: papila pre-cloacal (PrCP), post- cloacal (PoCP): anterior (a), media (m) y posterior (p), espícula (s). Fuente: Otranto *et al.*, 2003b.

Las hembras son más grandes y miden entre 12 y 18,5 mm de longitud y 370 y 510  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un esófago de una longitud media de 770  $\mu\text{m}$ . Presentan una cola roma y redondeada, dotada de un par de papilas laterales cerca de la extremidad. La vulva, provista de un labio corto, se encuentra en la región anterior, mientras que el orificio anal se ubica a 70-102  $\mu\text{m}$  del extremo caudal. El orificio vulvar se encuentra aproximadamente 62-162,2  $\mu\text{m}$  anteriormente a la unión esófago-intestinal (Yamaguti, 1961) (**Fig. 7**).



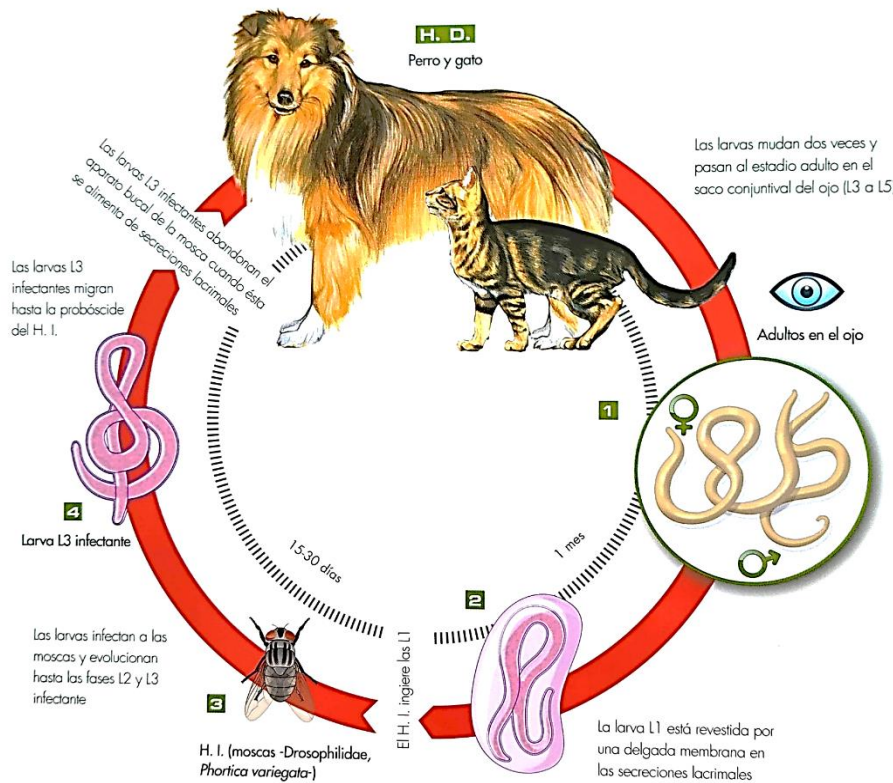
**Figura 7.** Micrografía óptica de la extremidad cefalica de una hembra de *Thelazia callipaeda* aclarada con solución de Amman: vulva (V); unión esófago-intestinal (UE).

#### 2.1.1.4. Biología

*Thelazia* spp. probablemente represente uno de los taxones más extraordinarios entre los nematodos debido a su relación con los hospedadores definitivos e intermediarios. Viven y se desarrollan en la cámara anterior del ojo, quedando así expuestos al aire y al medio ambiente. Debido a su localización en el hospedador definitivo, la thelaziosis es la única infección causada por un nematodo que puede tratarse tópicamente, por instilación directa de gotas oculares (Otranto y Traversa, 2005).

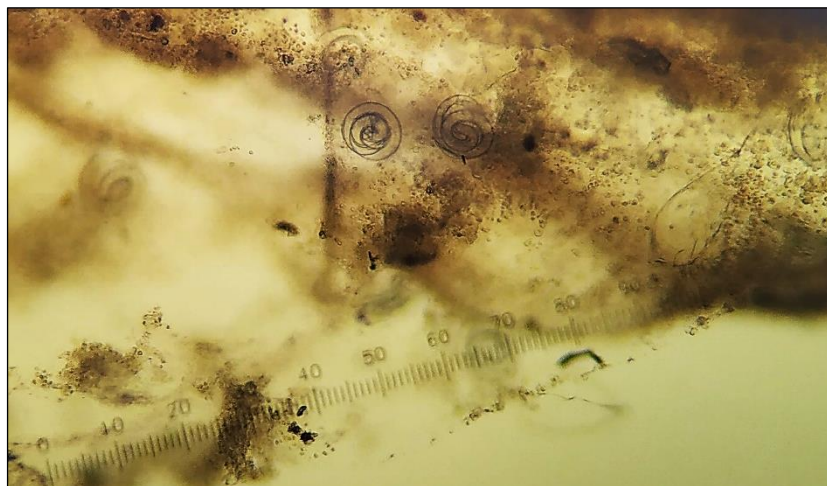
Además, *Thelazia*, junto con otros géneros dentro del Orden Spirurida (*Habronema* spp., *Stephanofilaria* spp. y *Parafilaria* spp.), son los únicos nematodos transmitidos por moscas secretófagas (Otranto y Traversa, 2005). Por lo tanto, su distribución coincide con la de *Phortica variegata* (Orden Diptera, Familia Drosophilidae), el único vector conocido hasta el momento para este nematodo en Europa

(Otranto *et al.*, 2005a, 2006b; Máca y Otranto, 2014). El ciclo biológico de *Thelazia* es heteroxeno, es decir, tiene lugar en dos hospedadores diferentes: el vector y un hospedador definitivo (**Fig. 8**).



**Figura 8.** Ciclo biológico de *Thelazia callipaeda*. Fuente: D. Carithers y G. Miró, 2012. Atlas de información al propietario: Parásitos. Editorial Servet.

Los nematodos adultos se localizan debajo del tercer párpado, en los conductos nasolacrimales, el saco conjuntival y los conductos excretores de las glándulas lacrimales del hospedador definitivo (carnívoros e incluso el ser humano). Una vez que las hembras han sido fecundadas por los machos, los huevos se desarrollan hasta el primer estadio larvario. Las hembras, vivíparas, depositan las larvas (L1) en el saco conjuntival, donde la mosca vector, *P. variegata*, alimentándose de las secreciones lacrimales ingiere dichas larvas (**Fig. 9**) (Otranto *et al.*, 2005a).

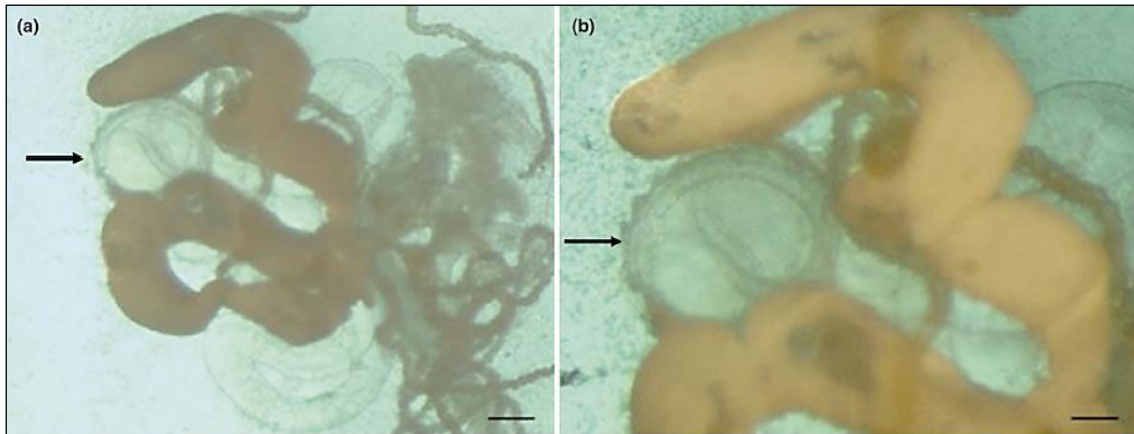


**Figura 9.** Micrografía óptica de varias L1 de *Thelazia callipaeda* en las secreciones lacrimales de un perro.

Según los resultados registrados por Kozlov (1962), que estudió la biología de *T. callipaeda* en condiciones experimentales, las L1 de *Thelazia* están envueltas con las membranas del huevo cuando son ingeridas por el vector; mientras, según los resultados obtenidos por Otranto *et al.* (2005a), las L1 de *Thelazia* son infectantes para las moscas cuando se localizan en las secreciones lacrimales fuera de la membrana del huevo y con los restos de la membrana que cubría el huevo en la extremidad posterior.

Hay un gran desconocimiento sobre el ciclo biológico de *T. callipaeda* en el vector. De hecho, el estudio realizado por Otranto *et al.* (2005) en condiciones experimentales, es el único que lo detalla y se describe a continuación: en el vector, las larvas permanecen encapsuladas en diferentes partes del cuerpo y se desarrollan desde L1 hasta L3, o forma infectante, en un intervalo de unos 14-21 días.

Las L1 se localizan en el tubo digestivo del vector el día +1 post-infección (p.i.), posteriormente migran (+2 y +3 días p.i.) a través de la cavidad celómica, donde permanecen durante dos días. Al tercer día, las larvas migran a los testículos de los machos de *Phortica* (Figs. 10a y 10b) o en la cavidad corporal de las hembras y aparece una cápsula alrededor de la L1 (día +4 p.i.), que adquiere la forma de un globo en la superficie del testículo del macho, mientras que en la hembra el quiste se fija a la pared de la cavidad abdominal por medio de un pedúnculo. En el quiste, la L1 aumenta de tamaño y empieza a estirarse (días +5 y +6 p.i.).



**Figura 10.** Asociación entre *Thelazia callipaeda* y el macho de *Phortica variegata*. **10a.** Testículos de un macho de *P. variegata* con un quiste (flecha) que contiene una larva de según estadio (L2) de *T. callipaeda* (200  $\mu\text{m}$ ); **10b.** El quiste se muestra a mayores aumentos (400  $\mu\text{m}$ ). Fuente: Otranto *et al.*, 2008a.

En esta etapa, se forma una segunda cápsula alrededor de la L1, la parte posterior de la larva se adelgaza y el intestino aparece semidesarrollado, evolucionando al segundo estadio larvario (L2). Luego, la larva pierde la primera cápsula (días +9 y +10 p.i.) y en los días +11 y +12 p.i., aumenta su longitud, el tracto digestivo está casi completo y son visibles los ganglios nerviosos. Desde el día +10 hasta +14 p.i., se han desarrollado completamente las L3, o formas infectantes, y salen de la cápsula para comenzar la migración a través de la cavidad celomática hacia el tórax y luego hacia la cabeza hasta la proboscis de *Phortica* (Otranto *et al.*, 2005a).

Cuando la mosca se vuelve a alimentar de las secreciones lacrimales, deposita las L3 en la cavidad ocular del hospedador definitivo (Otranto *et al.*, 2005a).

En el vector pueden desarrollarse diferentes estadios larvarios de *T. callipaeda* al mismo tiempo. El tiempo de desarrollo larvario aquí descrito puede variar de 2 a 4 días para cada estadio larvario y se ve influenciado por la temperatura ambiental (Otranto *et al.*, 2005a). De hecho, cuanto mayor es la temperatura, más rápidamente se desarrollan las primeras L3.

En lo que respecta al desarrollo de *T. callipaeda* en su hospedador definitivo, se dispone de muy pocos datos y, los datos que existen, también se obtuvieron solo en condiciones experimentales (Kozlov, 1962). *T. callipaeda* evoluciona al cuarto estadio

larvario (L4) en la cavidad ocular del hospedador definitivo a los 7 o 9 días p.i. La maduración completa de los nematodos machos tiene lugar después de 13 a 14 días y la de las hembras después de 22 a 25 días desde la infección (Kozlov, 1962). En este momento, las hembras ya presentan huevos en el interior del útero. A los 55 días p.i. se inicia la liberación de dichas larvas a la cavidad ocular.

Como veremos más adelante en el apartado 2.1.2.5. de la sección sobre *P. variegata*, aunque se ha demostrado que en condiciones experimentales tanto las hembras como los machos de *P. variegata* albergan larvas de *T. callipaeda* (Otranto *et al.*, 2005a), solamente los machos actúan como vectores de este nematodo en condiciones naturales (Otranto *et al.*, 2006b).

Tampoco se ha aclarado del todo cómo los diferentes estadios de este nematodo sobreviven al invierno. Se piensa que la hibernación de *T. callipaeda* puede seguir dos modalidades diferentes. La primera es una "hibernación endógena" que ocurre en los nematodos hembras en el hospedador definitivo infectado y puede ser causada por una baja tasa metabólica de las hembras en los ojos del hospedador a bajas temperaturas. La segunda es una "hibernación inducida" causada por cambios en el metabolismo de las moscas que conduce a la hibernación de las mismas (Otranto *et al.*, 2005a).

En el hospedador definitivo, los nematodos hembras presentan L1 en el útero todo el año, pero empiezan a liberar L1 al comienzo de la primavera, cuando *Phortica* vuelve a estar presente (Otranto *et al.*, 2004). Además, se estima que los adultos pueden vivir hasta un año dentro de los conductos naso-lacrimales y debajo del tercer párpado (Otranto *et al.*, 2005a).

Por otro lado, la presencia de etapas inmaduras de *T. callipaeda* en los ojos de perros infectados naturalmente a principios de la primavera podría indicar que los vectores infectados el verano anterior reanudan su actividad durante este período (probablemente después de la diapausa de invierno) para transmitir la L3 a los hospedadores definitivos (Otranto *et al.*, 2004).

### 2.1.2. *Phortica variegata*

La mosca *P. variegata*, Fallén, 1823 (Drosophilidae, Steganinae) es una drosófila que se alimenta de las secreciones lacrimales de muchas especies de mamíferos (Máca y Otranto, 2014). Los estudios disponibles en la literatura sobre *P. variegata* son escasos y solo en los últimos años, el papel de esta drosófila como vector del verme ocular *T. callipaeda*, tanto en condiciones experimentales (Otranto *et al.*, 2005a) como naturales (Otranto *et al.*, 2006b), ha despertado el interés de la comunidad científica. *P. variegata* (**Tabla IV**) es al día de hoy el único vector reconocido de *T. callipaeda* en los países europeos.

#### 2.1.2.1. Taxonomía

La taxonomía de los géneros *Amiota* y *Phortica* es un tema que ha sido ampliamente debatido; porque el género *Phortica* se consideraba un subgénero de *Amiota*. Solo recientemente se reconocieron los dos taxones como géneros distintos y *A. variegata* ha sido reclasificada taxonómicamente como *P. variegata* (**Tabla IV**) (Sidorenko, 2002; Máca, 2003; Yassin, 2013).

**Tabla IV.** Clasificación taxonómica de *Phortica variegata*. Fuente: “Iberfauna,” 2008.

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Phylum</b>	Arthropoda
<b>Clase</b>	Insecta
<b>Orden</b>	Diptera
<b>Suborden</b>	Brachycera
<b>Familia</b>	Drosophilidae
<b>Subfamilia</b>	Steganinae
<b>Género</b>	<i>Phortica</i>
<b>Especie</b>	<i>variegata</i>

**2.1.2.2. *Phortica* spp.**

El género *Phortica* incluye 122 especies, que se localizan principalmente en las regiones Oriental y Paleártica (Brake y Baechli, 2008; Cao *et al.*, 2011). La mayoría (aproximadamente 110) de las especies de *Phortica* se registraron en el este y sudeste de Asia y África, y el resto se encontró en Europa (**Tabla V**), la región del Mediterráneo, América del Norte y Central, Australia y el área del Pacífico.

**Tabla V.** Especies del género *Phortica* spp. que se han descrito en Europa.

<b>Especies</b>	<b>Distribución geográfica</b>	<b>Referencia</b>
<i>P. variegata</i>	Ampliamente distribuida en Europa	(Bächli <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. semivirgo</i>	Ampliamente distribuida en Europa	(Maca, 1977; Bächli <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. erinacea</i>	Detectada en Bulgaria	(Máca, 1977; Bächli <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. oldenbergi</i>	Especie originaria de Africa y detectada ocasionalmente en Berlín, en la primera mitad del siglo XX, aunque no se volvió a encontrar en Europa, a parte de este hallazgo ocasional	(Duda, 1924; Máca, 1977, 2003)
<i>P. goetzi</i>	Descrita en Turquía	(Maca, 1987)

La primera descripción de *T. callipaeda* en *P. variegata* fue publicada en 1962 por Kozlov, quien describió las larvas en la proboscis de *A. variegata* recolectadas en la región de Khabarovsk (Rusia) (Kozlov, 1962). Antes de empezar este trabajo de doctorado, los informes de *P. variegata* como vector de *T. callipaeda* en condiciones naturales se habían descrito solo en Italia, aunque su presencia también se había detectado en otros países europeos, entre ellos España, donde se habían denunciado casos de infección autóctona por *T. callipaeda* (Miró *et al.*, 2011).

Se ha postulado la hipótesis de que otras especies como *P. semivirgo* Maca, 1977 podrían jugar un papel en la transmisión del verme ocular (Cantacessi *et al.*, 2008), debido a su similitud con *P. variegata* y a su distribución geográfica coincidente (Bächli *et al.*,

2004; Otranto *et al.*, 2006a; Cantacessi *et al.*, 2008), pero hasta la fecha no se han encontrado ejemplares de *P. semivirgo* infectados por *T. callipaeda*.

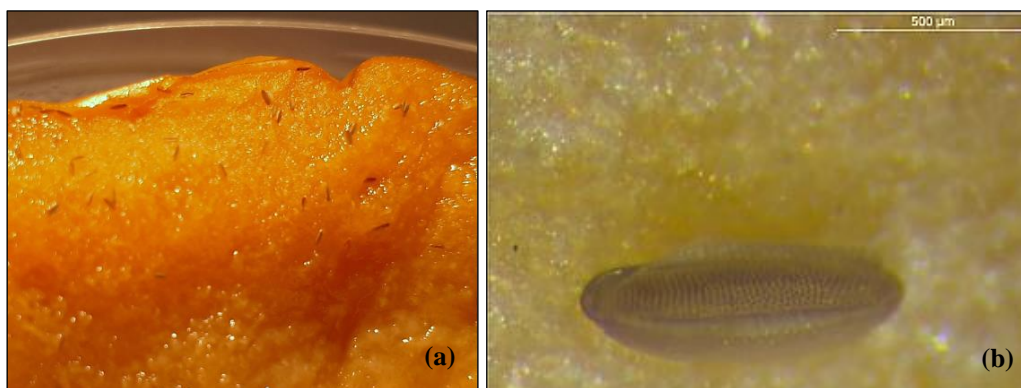
En una ocasión, se ha descrito que la especie *Musca domestica* Linnaeus, 1758 estaba infectada naturalmente por *T. callipaeda* (Shi *et al.*, 1988). *M. domestica* puede actuar como vector de otras especies de *Thelazia*, como *T. rhodesi* Desmarest, 1827 y *T. gulosa*; sin embargo, estudios más recientes no han conseguido demostrar en condiciones experimentales su papel como vector (Wang *et al.*, 2003; Otranto *et al.*, 2005b).

En los países asiáticos, donde este parásito se describió por primera vez, el vector de *T. callipaeda* es *Phortica okadai* Okada, 1956 (Wang *et al.*, 2002, 2003), y su distribución geográfica abarca Rusia, Corea, China y Japón (Brake y Baechli, 2008).

### 2.1.2.3. Morfología

Los dípteros del género *Phortica* son insectos holometábolos, con una fase de huevo, tres estadios larvarios, una pupa y una fase adulta. En la literatura hay pocas descripciones de los estadios inmaduros de esta especie, y en esta Tesis Doctoral se asocian las características descritas por otros autores (Bächli *et al.*, 2004) con las observadas en los estudios realizados.

El **huevo** tiene aspecto fusiforme con ambos extremos redondeados y los bordes externos ligeramente sobreelevados, a diferencia de otras *Drosophilinae* que presentan unos procesos filamentosos. Ambas características sirven para ampliar la superficie del huevo y mejorar el suministro de oxígeno (Máca y Otranto, 2014). Mide 1-2 mm de longitud y la coloración es marrón-grisácea (**Fig. 11**).



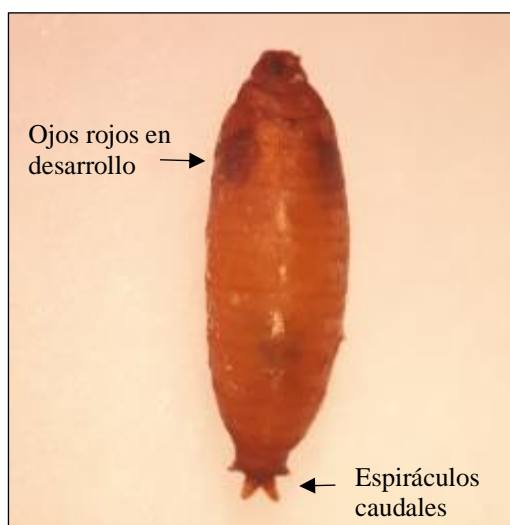
**Figura 11.** Huevo de *Phortica variegata* depositado en un sustrato de manzana; **11a.** Huevos obtenidos en condiciones de laboratorio a partir de especímenes capturados en el campo; **11b.** Detalle de un huevo bajo estereomicroscopio. Fuente: Máca y Otranto, 2014.

Las **larvas**, que pasan por tres estadios separados con sus correspondientes mudas, miden entre 1 y 5 mm. La cutícula es fina y permeable, la coloración blanquecina-transparente (**Fig. 12**), con diferentes espiráculos caudales, ganchos de arrastre ventrales y una serie de dentículos cerca del extremo posterior.



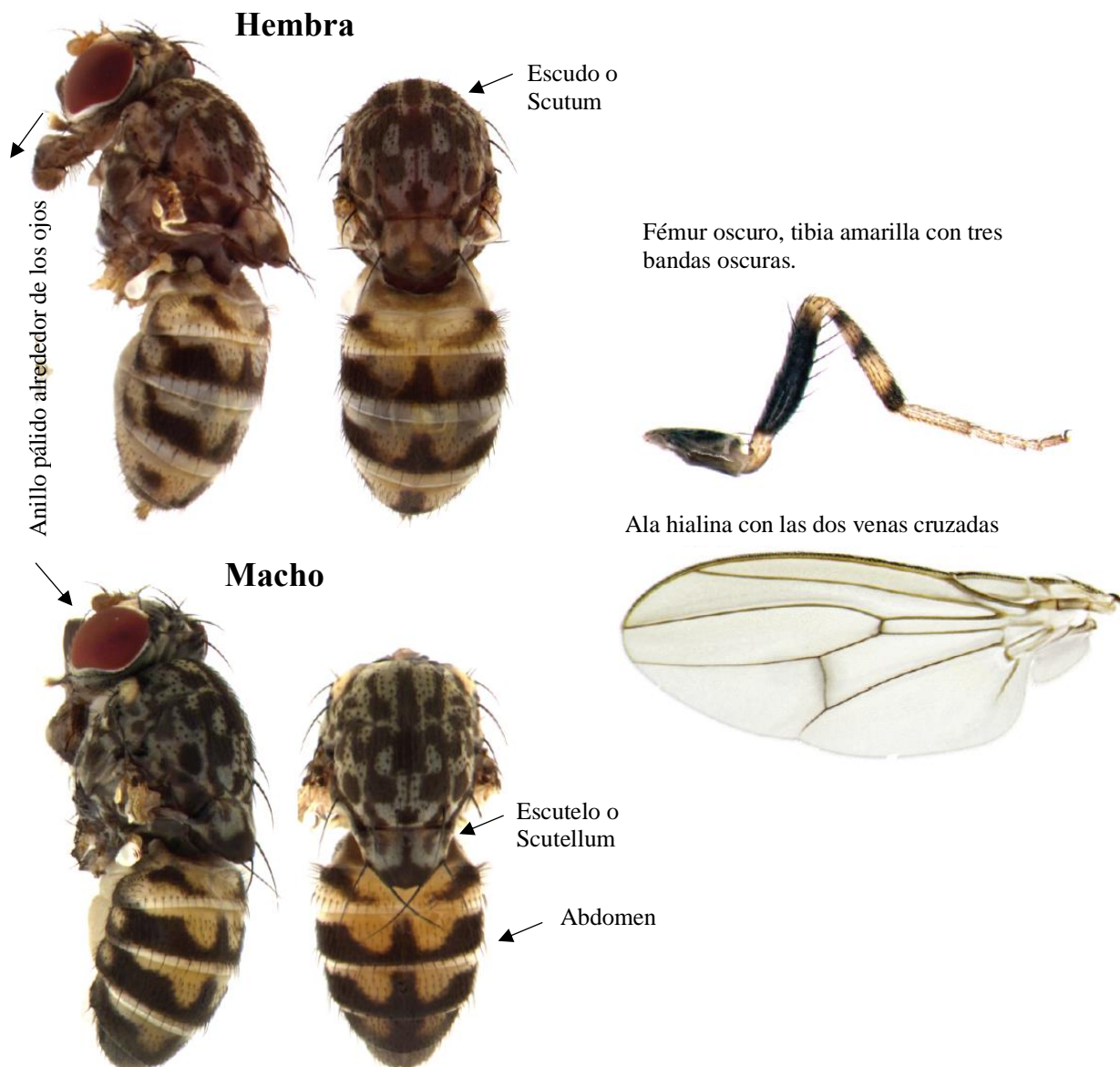
**Figura 12.** Primer estadio larvario de *Phortica variegata* alimentándose de un trozo de manzana (ciclo experimental).

En cualquier estadio, las especies difieren principalmente en la forma y tamaño del esqueleto cefalofaríngeo (piezas bucales) y los dentículos caudales (Bächli, *et al.*, 2004). La **pupa** presenta forma ovalada y suele ser de color marrón, compacto y con espiráculos caudales característicos por su forma. Mide entre 3 y 5 mm (**Fig. 13**).



**Figura 13.** Detalles morfológicos de la pupa de *Phortica variegata* obtenida en condiciones de laboratorio.

Las primeras descripciones morfológicas de los **adultos** del género *Phortica* fueron llevadas a cabo por Máca (1977) y Bächli *et al.* (2004). Posteriormente, se han realizado estudios para simplificar el proceso de identificación de las especies presentes en Europa (Otranto *et al.*, 2006a). En los estudios realizados, Otranto *et al.* (2006) examinaron 969 especímenes de *P. variegata* que presentaban las características morfológicas que se describen a continuación: los machos de *P. variegata* (3,5 - 4 mm) son generalmente de color marrón oscuro. El escudo, a diferencia de otras especies de Drosophilidae, es corto y presenta numerosas manchas grises parcialmente confluyentes y ocho filas irregulares de setas. El escutelo es mayormente oscuro con manchas grisáceas. Las extremidades se caracterizan por presentar una coxa oscura, un fémur oscuro con base y ápice y tibias amarillos con tres bandas oscuras alrededor (**Fig. 14**). El tarso es generalmente amarillo, a veces con la parte apical del último segmento oscuro. Las alas son hialinas, pero con las dos venas cruzadas oscuras y, por lo tanto, claramente visibles (**Fig. 14**). Las dos interrupciones de la vena costal son de interés taxonómico distintivo de la familia Drosophilidae. Los ojos rojos presentan alrededor un anillo claro (**Fig. 14**). Las antenas son de color amarillo dorado. La arista tiene 3-6 ramas dorsales que disminuyen progresivamente en longitud hasta la punta. El abdomen tiene bandas oscuras en número de tres transversales y una longitudinal (visible dorsalmente) (**Fig. 14**); el último tergito es romo y cubre la estructura compleja de los genitales internos (terminalia) (**Fig. 14**). La clarificación de la terminalia masculina permite observar la presencia de 3 "dientes" (sensila) en la rama medial y una sensila en la rama dorsal de la paráfisis externa (parámetro anterior).



**Figura 14.** Características morfológicas de una hembra y un macho de *Phortica variegata*. Fuente: Werner y Jaenike, 2017.

Las hembras (3,5-5 mm) son generalmente más claras que los machos debido a su abdomen muy voluminoso. El último tergito es cónico con varios pelos (**Fig. 14**). Los otros caracteres morfológicos son iguales que en los machos.

La tinción tarsal puede servir para diferenciar *P. variegata* y *P. semivirgo*, ya que esta última tiene todo el último segmento, al menos la mitad del penúltimo (cuarto) y, a menudo, el ápice del tercer segmento oscuro. En cualquier caso, la identificación a nivel de especie debe confirmarse mediante la aclaración de la terminalia masculina. Las

hembras de las dos especies se distinguen por la diferente estructura de los escleritos vaginales (Máca, 1977).

Otranto *et al.* (2008) desarrollaron una herramienta de identificación PCR(RFLP) para diferenciar *P. variegata* de *P. semivirgo* (Cantacessi *et al.*, 2008).

#### **2.1.2.4. Metodos de captura**

##### **- Trampa de cebo**

Roggero *et al.* (2010) diseñaron dos tipos de trampas basadas en la atracción de las drosófilas por los trozos de fruta colocados en su interior. Unas aberturas pequeñas evitaban que entraran insectos más grandes, y a través de un sistema de embudos y componentes oscuros una vez que los insectos eran capturados se conseguía que no fuesen capaces de escapar de la trampa. La trampa “a” está representada en la **Fig. 15**. En la trampa “b”, se usó un recipiente grande de tereftalato de polietileno (PET), orientado horizontalmente, con una sola abertura circular cubierta por una red (malla de 0,4 mm) que se estrechaba a través de un embudo hacia un lado de la trampa.



**Figura 15.** Representación esquemática de una trampa. (a) Componentes individuales de la trampa; (b) Trampa ensamblada. Se colocan trozos de fruta en el fondo pintado de negro de una botella de tereftalato de polietileno (PET) de 1,5 litros y se cubren con una red (media). Se cortan tres pequeñas aberturas de aproximadamente  $3 \times 0,5$  cm en el extremo oscuro de otra botella de PET y se cubren por una red (malla de 4 mm). La construcción del sistema cónico con la segunda botella de PET que encaja en la parte transparente superior de la primera botella evita que los insectos capturados escapen ya que los insectos tienden a dirigirse hacia la luz. Los sujetapapeles y el cable fijan las dos partes oscuras de la botella. Fuente: Roggero *et al.*, 2010.

Estos tipos de trampas se instalaron una cerca de la otra (distancia máxima de 40 cm) y todas se cebaron con rodajas de manzanas frescas y plátanos pelados, cambiando el cebo una vez por semana, después de la recolección de las moscas. Con la trampa “a” se consiguió la recolección de un mayor número de ejemplares (Roggero *et al.*, 2010).

#### **- Captura a través de manga entomológica (manguero o *netting*)**

Este tipo de captura se realiza con el uso de mangas entomológicas o cazamariposas. Las moscas se pueden capturar alrededor de los ojos de una persona (cebo humano), o simplemente paseando por un bosque de robles, o con el uso de “trampas de fruta” que consisten en trozos de fruta fermentados y recogidos en un trapo que luego se ata alrededor de un árbol o de algún tipo de soporte (Otranto *et al.*, 2006a).

Las moscas capturadas se trasladan a unas jaulas formadas por una malla con aberturas de 1 mm de diámetro. En la parte superior de la jaula se suelen colocar trozos de frutas como fuente de alimentos para los insectos.

#### 2.1.2.5. Biología

El ciclo biológico de *P. variegata* todavía no ha sido del todo aclarado y los datos presentes en la literatura hacen referencia a un único estudio donde se consiguió llevar a cabo una colonia de *P. variegata* en condiciones experimentales (Otranto *et al.*, 2012). Las hembras de *P. variegata* en condiciones experimentales depositan los huevos sobre trozos de fruta (**Fig. 11**). A modo de resumen, los tiempos medios para el desarrollo de los huevos a L1 y los diferentes estadios larvarios (**Fig. 12**) y a pupa (**Fig. 13**) se resumen en la **Tabla VI**.

El ciclo de vida de *P. variegata* se ha registrado que se completa en un mínimo de 9 días (en julio y agosto) y hasta un máximo de 18 días (en junio). Las hembras fecundadas de *P. variegata* silvestres ponen huevos aproximadamente 2 días después de la recolección, y las larvas emergen del huevo de 2 a 12 días después de la oviposición, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad (**Tabla VI**). Inmediatamente después de la eclosión, las L1 empiezan a alimentarse de la fruta madura empleada como sustrato para la oviposición.

**Tabla VI.** Número, sexo, relación macho/hembra (M/H) de especímenes de *Phortica variegata* recolectados cada mes, junto con la temperatura (T<sup>a</sup> expresada en °C) y la humedad relativa (HR expresada en porcentaje) registradas en el sitio de captura. Número de muestras y tiempo de desarrollo (expresado como t mínimo-t máximo) de las etapas del ciclo biológico desde la oviposición: 1er estadio larvario (L1); 2do estadio larvario (L2); 3er estadio larvario (L3); pupas; adultos. Datos publicados en condiciones de laboratorio, junto con la tasa de supervivencia (expresada en porcentaje) desde el huevo hasta la etapa adulta. Fuente: Otranto *et al.*, 2012.

Mes	T <sup>a</sup> HR	N° moscas (M/H)	M/F ratio	N° huevos (t min y max)	N° L1 (t min y max)	N° L2 (t min y max)	N° L3 (t min y max)	N° pupe (t min y max)	N° adultos (t min y max)	% de supervivencia
<b>Mayo</b>	22°C 45%	35 21M/14H	1,5	18 (+3/6d)	9 (+4/8d)	4 (+7/8d)	1 (+10d)	0	0	0%
<b>Junio</b>	14°C 80%	28 4M/24H	0,16	27 (+5/9d)	21 (+6/12d)	17 (+9/16d)	11 (+10/15d)	9 (+12/18d)	5 (+15/18d)	18,5%
<b>Julio</b>	23°C 75%	101 33M/68H	0,48	126 (+1/5d)	86 (+2/6d)	68 (+3/6d)	62 (+5/9d)	59 (+7/10d)	45 (+9/13d)	35,8%
<b>Agosto</b>	28°C 68%	269 207M/62H	3,34	56 (+1/4d)	52 (+2/4d)	48 (+3/5d)	41 (+5/7d)	38 (+7/8d)	35 (+9/12d)	62,5%
<b>Septiembre</b>	23°C 75%	142 142M/0H	0	-	-	-	-	-	-	-
<b>Octubre</b>	16°C 83%	18 11M/7H	1,58	-	-	-	-	-	-	-

Los ejemplares de *P. variegata* vuelan lentamente en pequeños círculos verticales alrededor del cebo antes de aterrizar en él (comportamiento de "búsqueda") (Otranto *et al.*, 2006a). Esta observación concuerda con los hallazgos de Okada (1962), quien observó el mismo comportamiento en el género *Amiota*, del cual *Phortica* se consideraba anteriormente un subgénero.

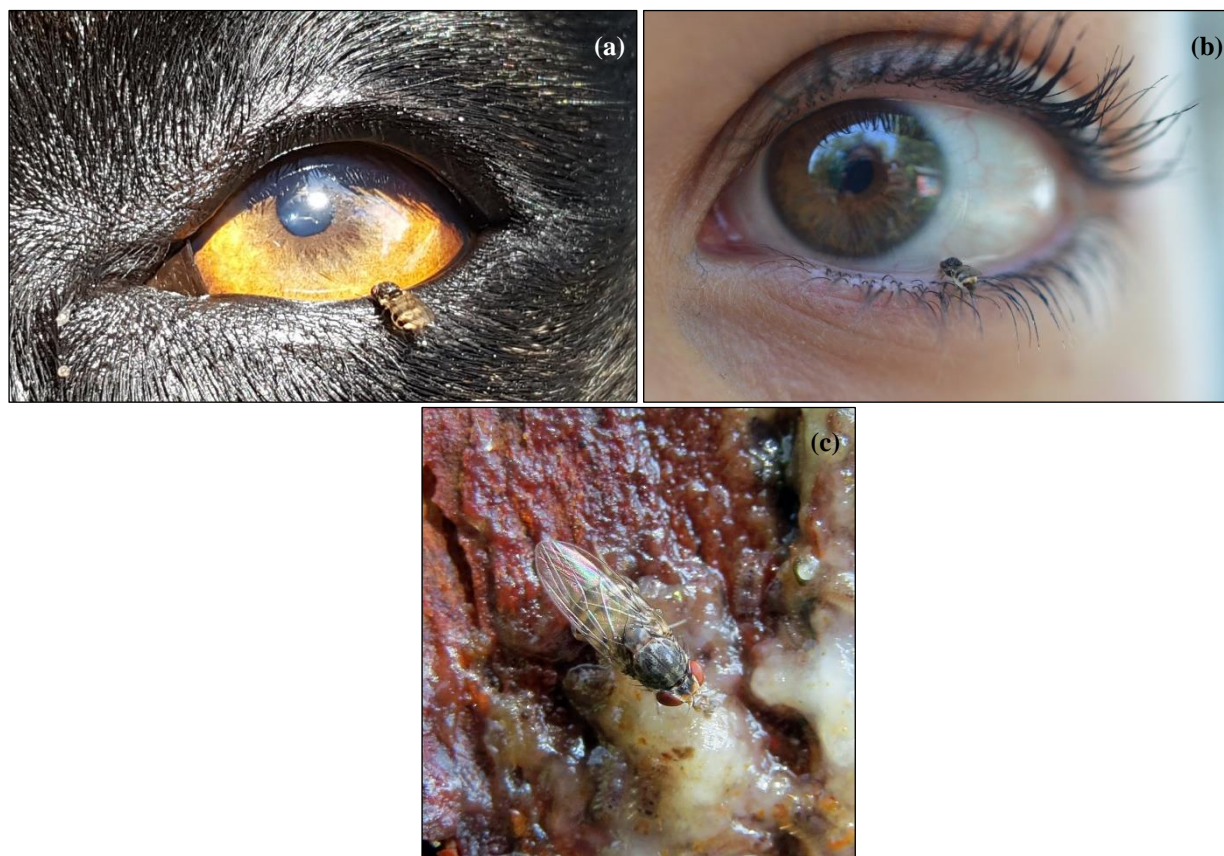
Curiosamente, en condiciones naturales se ha incriminado al macho de *P. variegata* como vector de *T. callipaeda* (Otranto *et al.*, 2005a; Otranto *et al.*, 2006a). En cambio, en condiciones experimentales, se ha constatado que tanto los machos como las hembras de *P. variegata* pueden actuar como hospedadores invertebrados de este nematodo (Otranto *et al.*, 2005a). Parece que son las preferencias tróficas de los machos, también denominadas comportamiento lacrífago o lacrifagia (Otranto *et al.*, 2006b; Panadero-Fontán y Otranto, 2015), las que hacen posible la ingesta de las larvas de primer estadio (L1) de *T. callipaeda* que se desarrollan en su interior a "larvas infectantes" (L3), y que posteriormente son transmitidas al hospedador definitivo (carnívoros domésticos y salvajes, lagomorfos y humanos) (Otranto *et al.*, 2012; Máca y Otranto, 2014; Colella *et al.*, 2016a). De hecho, se ha comprobado que estos estadios larvarios se desarrollan en los testículos del vector (**Fig. 10**) (Otranto *et al.*, 2005a).

Las preferencias tróficas de las hembras, en cambio, están más relacionadas con la ingesta de frutas y otras materias vegetales (Dorchies *et al.*, 2007; Máca y Otranto, 2014). Estas preferencias justifican el hecho de que la relación entre machos y hembras, recolectados en condiciones naturales, también varía según el tipo de cebo utilizado. Algunos autores describen que el método de captura que utiliza un "cebo humano" permite recolectar solo machos (Otranto *et al.*, 2006b), aunque otros han descrito la captura de ejemplares de ambos sexos con este método (Roggero *et al.*, 2010). Con el cebo de fruta la relación macho/hembra parece ser de 1:3,8 (Otranto *et al.*, 2006b). Los hallazgos anteriores sugieren que las moscas del género *Phortica* recolectadas en vuelo alrededor de los ojos de humanos y animales son en su mayoría machos, mientras que las moscas recolectadas en cebos de fruta tienen una proporción de sexos relativamente equilibrada (Roggero *et al.*, 2010). Esto fue descrito también por otros autores que compararon especímenes taiwaneses (Máca y Lin, 1993), especímenes búlgaros (Máca, 1977), y especímenes rusos (Kozlov, 1963), los cuales fueron recolectados de alrededor

de los ojos, con especímenes checos (Máca, 1977), que fueron recogidos alrededor de trampas de fruta.

Se han postulado tres principales teorías para explicar por qué este comportamiento trófico (**Fig. 16**) estaría vinculado específicamente a los machos de *P. variegata*:

- 1) que requieren un alto contenido de proteínas para completar el ciclo gonotrófico (Otranto *et al.*, 2006a, 2006b; Roggero *et al.*, 2010). Esta hipótesis está avalada por el predominio de los machos alrededor de los ojos de los hospedadores animales y humanos en condiciones naturales. Por el contrario, la fruta sigue siendo la fuente de alimento que las hembras “prefieren”, como lo indica el hecho de que (i) en condiciones experimentales son principalmente las hembras las que albergaban L3 después de que estas sean añadidas a la fruta de la que las hembras se alimentan, (ii) que las hembras ponen huevos en sustratos representados por manzanas y/o peras, (iii) en el campo son atraídas principalmente por los cebos de frutas (Otranto *et al.*, 2006b).
- 2) que su comportamiento lacrífago podría considerarse como una ofrenda que luego estos dedicarían a las hembras (Bänziger *et al.*, 2009). El exceso de proteína que los machos absorben de las lágrimas podría crear el espermátforo proteico que necesita la hembra para soportar la ovogénesis (Máca y Otranto, 2014).
- 3) que el aporte de sodio de las secreciones lacrimales fuera necesario para su desarrollo, pero de momento es solo una hipótesis (Máca y Otranto, 2014) puesto que hasta la fecha no se ha realizado ninguna investigación para avalar esta teoría.



**Figura 16.** Adultos de *Phortica variegata* alimentándose. **16a.** En las secreciones lacrimales de un perro en El Escorial, Madrid. **16b.** En las secreciones lacrimales de la autora en Bari, Italia. **16c.** En la savia de un *Quercus* sp en Inglaterra. Cortesía: Steven Falk.

Se ha observado que el hábitat en el que se recolectan especímenes de *Phortica* se caracteriza por la presencia de bosques de roble, situados a unos 850 m sobre el nivel del mar (m s.n.m.), y por una elevada humedad relativa (Otranto *et al.*, 2006a). Parece que la actividad biológica de las moscas *Phortica* es más alta cuando la temperatura y la humedad relativa son de unos 20-25°C y 50-75%, respectivamente (Otranto *et al.*, 2006a). La vegetación se caracteriza además por la presencia de frutales.

La presencia y la densidad de las moscas varía a lo largo de la época de actividad de *P. variegata*. Otranto *et al.* (2006) describieron que entre mayo y septiembre la mayoría (89%) de las moscas fueron recolectadas alrededor del cebo de fruta, mientras que, de agosto a octubre, el número de las moscas capturadas alrededor de los ojos del cebo humano aumentó progresivamente, alcanzando su punto máximo en septiembre cuando todas las moscas fueron capturadas alrededor de los ojos.

El hábitat natural de las fases larvarias de *P. variegata* es casi completamente desconocido. En una sola nota, Okada (1968) informa que observó "...larvas completamente desarrolladas que se deslizaban desde la superficie del tronco hasta el suelo, donde buscaban sitios para pupar". En condiciones experimentales, las larvas se alimentan de fruta madura.

#### 2.1.2.6. Fenología

*Phortica variegata* presenta un patrón estacional y, en el área mediterránea del sur de Italia, se ha observado que está activa de abril a octubre, mientras que, durante las estaciones más frías, las moscas entran en diapausa en invierno (Otranto *et al.*, 2005a).

Poco se sabe sobre los factores que contribuyen a la supervivencia de *P. variegata* durante el invierno. Los cambios en la composición de la grasa corporal de las moscas en diapausa juegan un papel importante para su supervivencia en fase adulta durante los meses más fríos (Chirico, 1994; Arme *et al.*, 2019). De hecho, algunos estudios han confirmado la importancia de estos cambios en la grasa corporal en varias especies de insectos que trascurren el invierno en su estadio adulto o larvario y acumulan ácidos grasos tolerantes a la congelación para prepararse a la diapausa (Davis y Lee, 2001; Marshall *et al.*, 2014). El hallazgo de más ácidos grasos insaturados que saturados en el cuerpo de las moscas durante la diapausa puede deberse a que los ácidos grasos insaturados permanecen en estado líquido a temperaturas más bajas, proporcionando propiedades anticongelantes en adaptación a la supervivencia en invierno (Ohtsu *et al.*, 1993). De hecho, las especies de regiones más frías tienden a almacenar más ácidos grasos insaturados, que son menos eficientes desde el punto de vista energético, pero tienen la cualidad de ser resistentes a la congelación (Ohtsu *et al.*, 1993). Esta adaptación se ha descrito en muchas especies de insectos (Sinclair y Marshall, 2018).

En un estudio, para valorar si la infección de *P. variegata* por larvas de *T. callipaeda* podía afectar a la supervivencia y a la biología del vector durante el invierno, se observó que *T. callipaeda* puede permanecer en hipobiosis hasta 147 días en su vector y no hay evidencia de que la infección por *T. callipaeda* determine una mayor mortalidad de las moscas durante la diapausa (Arme *et al.*, 2019).

### 2.1.2.7. Distribución geográfica

Los datos sobre la distribución geográfica de *P. variegata* se limitan a la descripción de los lugares donde fueron capturados estos dípteros (Kozlov, 1963; Máca, 1977; Máca and Lin, 1993; Bächli et al., 2004; “GBIF”, s.f.) y las latitudes de los países europeos donde se han recogidos ejemplares de *P. variegata* coinciden, en muchos casos, con las latitudes de los países donde la thelaziosis es endémica (entre 37° y 46° N) (Otranto et al., 2003a; Roggero et al., 2010; Motta et al., 2014).

A parte de España, los países en los que se han realizado estudios sobre la presencia y la dinámica estacional de *P. variegata* son Italia, Suiza, Reino Unido, Eslovaquia y Estado Unidos (Otranto et al., 2006b, 2018; Roggero et al., 2010; Palfreyman et al., 2018; Čabanová et al., 2018).

En Italia, se recogieron ejemplares de *P. variegata* en un área del sur (Oliveto Lucano, región de Basilicata) donde se habían descrito elevadas prevalencias de infección por *T. callipaeda* entre los meses de mayo y noviembre (Otranto et al., 2006a).

En Suiza, se registró la presencia de ejemplares de *P. variegata* en tres sitios de muestreo desde abril hasta finales de octubre: Sitio 1: localidad Gentilino, altitud 469 m s.n.m., Sitio 2: localidad Bodio, altitud 320 m s.n.m.; ambos localizados en llanura, donde la temperatura media anual es de 11,6 °C y situados en la parte central y sur del Ticino, donde se registraron las mayores prevalencias de *T. callipaeda* en perros en Suiza (Malacrida et al., 2008). El Sitio 3: ubicado al norte de los Alpes, en las afueras de la ciudad de Zúrich, con altitud de 408 m s.n.m. y clima más frío (clima atlántico, precipitación 1000–1500 mm/año, temperatura media anual 2–3 °C más baja que al sur de los Alpes) y donde hasta ahora no se han registrado casos autóctonos de *T. callipaeda* (Roggero et al., 2010). En otros sitios ubicados a mayores altitudes (por encima de 1200 m s.n.m.) no fue capturada ninguna mosca (Roggero et al., 2010).

En Reino Unido, la presencia de *P. variegata* se ha descrito en algunos municipios del sur del país (Gibbs, 2003; Clemons, 2009; Chandler, 2014; Falk, 2015; Palfreyman et al., 2018).

En España, hay datos sobre la presencia de *P. variegata* en la comarca de Sotomontano, provincia de Huesca, gracias a un artículo publicado por Carlos Pradera en

2015 donde se cita “*El primer recuerdo que tengo de esta pequeña mosca es de niño en el pueblo de mi abuela, en la comarca del Somontano. Íbamos a jugar a la cabañera, al camino por donde transitaban los pastores con sus ovejas. [...] También recuerdo que en esa zona abundaba esta mosca que se te metía en el ojo. Automáticamente te llevabas las manos a la cara y te frotabas un buen rato el ojo*” (Pradera, 2015). En el mismo artículo se describe la detección de la mosca en la comarca pirenaica del Pallars Sobirà, provincia de Lleida. En la sección de resultados de este trabajo, se describen los estudios llevados a cabo en España en esta Tesis Doctoral relacionados con la distribución de este vector.

La presencia de *P. variegata* se ha descrito también en Eslovaquia en varios puntos del país (revisado por Čabanová *et al.* 2018). Los ejemplares de *P. variegata* se observaron muy cerca del área en el este de Eslovaquia de donde procedían los zorros y perros infectados (Čabanová *et al.*, 2018). Además, *P. semivirgo*, otro vector potencial de *T. callipaeda* en Europa, también se describió en Eslovaquia (Máca y Otranto, 2014; Čabanová *et al.*, 2018). Como se ha dicho anteriormente, se describió como un hallazgo ocasional la presencia de un macho de *P. variegata* (junto con cinco hembras *Drosophila kuntzei* Duda) en este país en 2002 (en la cueva Zikmundova, a 5 km al norte de Margecany) (Otranto *et al.*, 2006a).

También, se recogieron ejemplares de *P. variegata* en Bulgaria y en República Checa (Cantacessi *et al.*, 2008).

En Estados Unidos, aunque no se ha descrito todavía la presencia de *T. callipaeda*, *P. variegata* se ha encontrado en Nueva York (Otranto *et al.*, 2018). Las moscas fueron recolectadas en un bosque compuesto principalmente por robles (*Quercus* spp.) en Highland Park, Rochester, Nueva York (43°N, 240 m s.n.m.). Además, se ha demostrado en condiciones experimentales que las moscas recolectadas en los EE. UU. pueden transmitir larvas de *T. callipaeda* (Otranto *et al.*, 2018). Asimismo, se ha registrado la presencia de *P. variegata* en América del Norte y más recientemente en Canadá (Werner y Jaenike, 2017; Miller *et al.*, 2019).

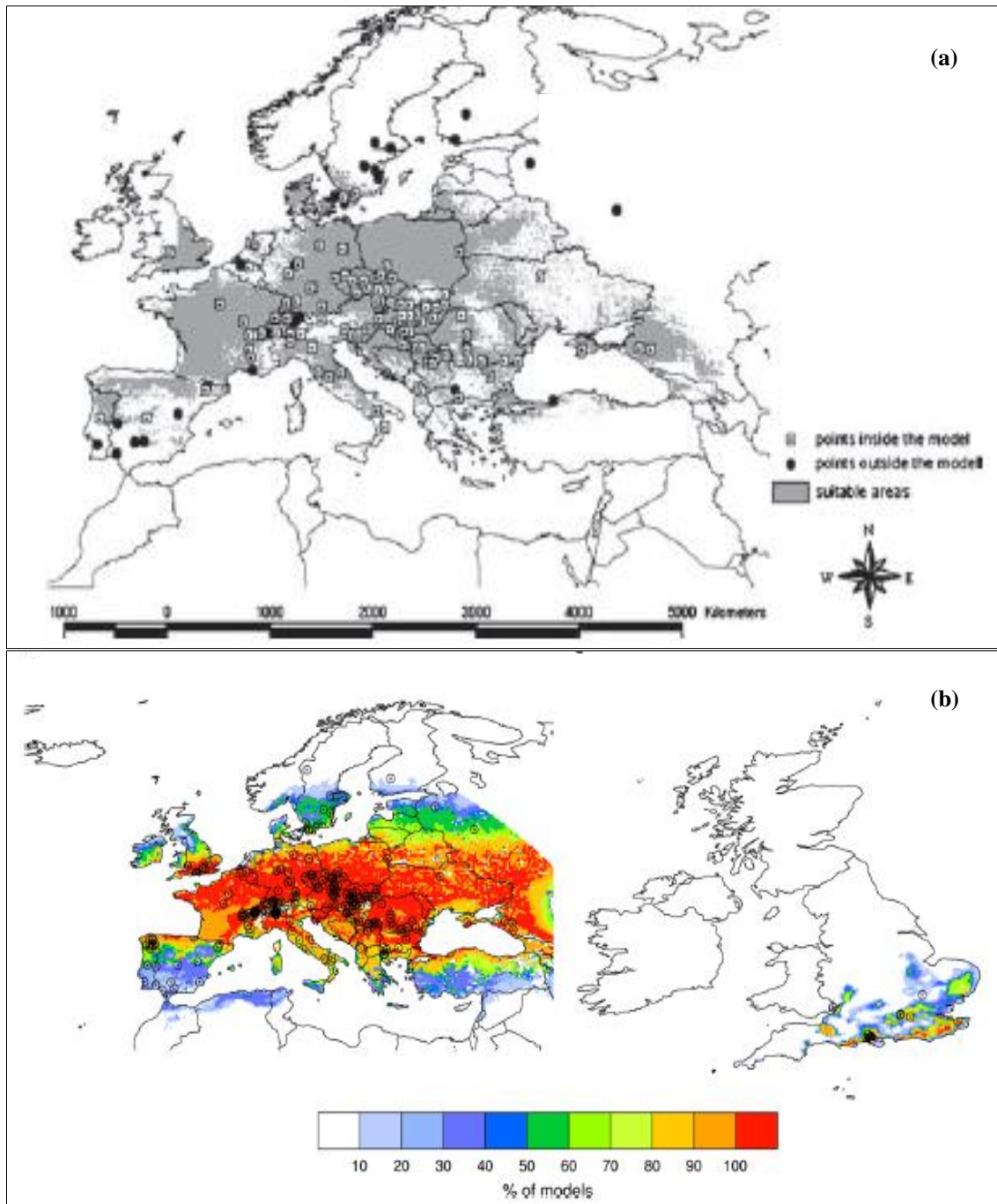
En los últimos años, se han publicado dos estudios para estimar los posibles nichos ecológicos de *P. variegata* en Europa. En ambos se utilizó el software GARP (Algoritmo

genético para la predicción de conjunto de reglas) para definir un modelo predictivo de áreas geográficas potencialmente adecuadas para el desarrollo de *P. variegata*.

El primer modelo (**Fig. 17a**) sugiere que muchas áreas de Europa son adecuadas para el desarrollo de *P. variegata*, estimando la propagación actual de *T. callipaeda* a zonas previamente no endémicas en Europa y, específicamente en Italia. En Europa, los países de Europa central (Francia, Alemania, Polonia, República Checa, Hungría) emergieron como áreas especialmente idóneas para la presencia del vector (Otranto *et al.*, 2006a). El modelo presentado en este estudio se construyó sobre la base de datos climáticos (de entre 1960 y 1990) y ambientales de 240 localidades en las que se había descrito la presencia de *P. variegata* y *T. callipaeda* y/o solo *P. variegata* (Otranto *et al.*, 2006a).

El segundo modelo GARP (**Fig. 17b**) en su mayoría de acuerdo con los resultados descritos anteriormente, añade más áreas que son adecuadas para el desarrollo de *P. variegata*, sobre todo en los países del este (por ejemplo, Ucrania, Rusia y el norte de Turquía) (Palfreyman *et al.*, 2018).

El conocimiento de otros aspectos relacionados con la actividad biológica de los adultos de *P. variegata* (por ejemplo, rango de actividad de vuelo, longevidad) podría aumentar la precisión y la sensibilidad de este tipo de modelo y, en consecuencia, ayudar a la comprensión de la dinámica de la thelaziosis humana y canina en otras áreas (Otranto *et al.*, 2006a).



**Figura 17.** Modelos elaborados para valorar la distribución geográfica de *Phortica variegata* en Europa. **17a.** Las áreas grises indican áreas identificadas por el modelo GARP como adecuadas. Los cuadrados punteados indican puntos, donde se conoce la presencia de *P. variegata*, que caen dentro de las áreas indicadas por el modelo. Los puntos negros caen fuera del modelo. Fuente: Otranto *et al.*, 2006a. **17b.** La coloración del mapa de calor indica la capacidad de predicción del modelo. Los puntos donde se conocía la presencia de *P. variegata* y que se utilizaron para crear el modelo se representan mediante puntos de ubicación. Fuente: Palfreyman *et al.*, 2018.

## 2.2. Epidemiología

### 2.2.1. Desarrollo histórico: antecedentes

*Thelazia callipaeda* fue descrito por primera vez por Railliet y Henry (1910) en especímenes recogidos de la membrana nictitante de un perro en Rawal Pindi, Punjab, India (Faust, 1928). El mismo año, Evans y Rennie registraron la presencia de casos de esta parasitosis en perros en Birmania (Evans y Rennie, 1910). La primera descripción en China fue en 1917 en dos perros en Pekín (Stuckey, 1917). Poco después, se encontraron e identificaron los mismos vermes en el fórnix superior del ojo derecho de un agricultor en el sudeste de China, confirmando que *T. callipaeda* podía infectar tanto a perros como a humanos (Stuckey, 1917).

Desde entonces, se ha ido acumulando una cantidad considerable de informes relacionados con la biología, morfología, patogenicidad y distribución geográfica de este nematodo en China (Faust, 1928), aunque muchos de estos datos son difíciles de interpretar por estar escritos en chino y por la naturaleza improbable de algunos de los mismos (Otranto *et al.*, 2003a; The Editors, Japanese Journal of Ophthalmology, 2011; Otranto y Dantas-Torres, 2015).

En un primer momento, la infección por *T. callipaeda* se denunció en humanos y perros en Rusia (Kozlov, 1962) y en algunos países de Asia como Tailandia (Bhaibulaya *et al.*, 1970), China (Shi *et al.*, 1988), Corea (Hong *et al.*, 1981), Indonesia (Kosin *et al.*, 1989), India (Singh y Singh, 1993), Japón (Koyama *et al.*, 2000) y Birmania (Anderson, 2000). Por eso, *T. callipaeda* se conoció durante mucho tiempo como el “verme oriental del ojo”, debido a que su distribución geográfica estaba originalmente limitada a países asiáticos (Anderson, 2000).

En las últimas décadas, la infección por este nematodo se ha descrito cada vez más tanto en animales domésticos (perros y gatos) y carnívoros silvestres (zorros, lobos, garduña y gatos salvajes) (Otranto *et al.*, 2009c), como en humanos en varios países de Europa (Otranto y Dutto, 2008; do Vale *et al.*, 2020), detectándose por primera vez en Italia (Rossi y Bertaglia, 1989).

A pesar de los numerosos casos en otras especies animales, el principal hospedador y reservorio final de *T. callipaeda* es el perro, que se define como “centinela”

en esta parasitosis emergente (Otranto y Deplazes, 2019). De hecho, como veremos, las primeras descripciones de la infección en la mayoría de los países europeos han sido en esta especie, en la cual además se denuncian las prevalencias más altas.

Con respecto al origen de la enfermedad en Europa, se han formulado varias hipótesis. En un primero momento, se pensó que *T. callipaeda* había sido importada de las regiones orientales por medio de un hospedador definitivo (perro, gato y/o zorro) y luego en Italia el parásito había encontrado el vector para completar el ciclo. Otra teoría apuntaba que el díptero que albergaba las formas infectantes de *Thelazia* había sido importado de las regiones orientales (Otranto *et al.*, 2003a).

Lo más probable es que la infección por *T. callipaeda* en Europa sea autóctona y haya originado a partir de un progenitor ancestral común al aislado asiático, como ha demostrado el análisis filogenético que sugiere que el aislado europeo y el asiático son dos subpoblaciones distintas (Zhang *et al.*, 2018).

### **2.2.2. Importancia mundial de la infección por *Thelazia callipaeda***

El cambio global, que incluye el efecto combinado de cambios tanto climáticos como medioambientales, fruto del impacto del ser humano sobre su entorno, puede incrementar el riesgo de transmisión de las enfermedades transmitidas por vectores y está causando la aparición de nuevas enfermedades infecciosas y zoonóticas (Jones *et al.*, 2008; Otranto *et al.*, 2009a; Otranto y Eberhard, 2011). Estos cambios, además de influir en la distribución de varios parásitos zoonóticos, también pueden influir en la distribución de sus vectores (por ejemplo, garrapatas, pulgas, moscas negras, mosquitos y flebotomos) (Otranto *et al.*, 2010; Colwell *et al.*, 2011) que se dispersan hacia regiones anteriormente libres, encontrando ahora las condiciones climáticas idóneas para su sobrevivencia.

Lo expuesto anteriormente, ha determinado que, en los últimos quince años, algunos helmintos zoonóticos, como *T. callipaeda*, adquieran cada vez más importancia y se enmarquen dentro del grupo de enfermedades transmitidas por vectores (VBH: helmintos transmitidos por vectores) definidas como “emergentes” para los animales y las personas en varios países de Europa y del mundo, donde la enfermedad no existía previamente (Otranto y Dutto, 2008; Otranto *et al.*, 2010; Colwell *et al.*, 2011; Tahir *et*

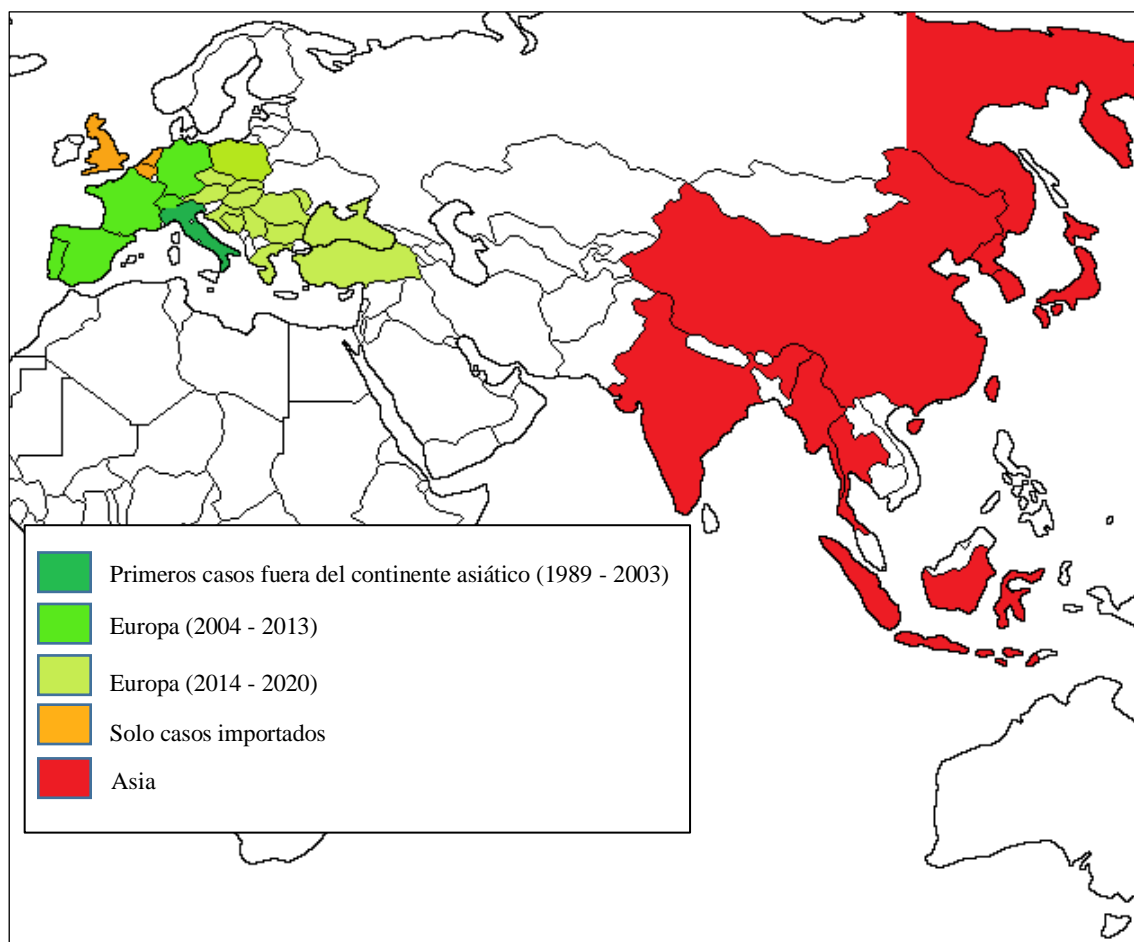
al., 2019). La rápida difusión que ha tenido esta parasitosis sugiere que tanto los casos registrados como los países afectados tienen una tendencia creciente.

La thelaziosis es una de estas enfermedades que afectan tanto al ser humano como a otros vertebrados. Entre las especies de *Thelazia* conocidas, tres son causantes de zoonosis: *T. callipaeda*, *T. californiensis* y *T. gulosa*.

### **2.2.3. Expansión geográfica de la thelaziosis canina en Europa**

En Europa, *T. callipaeda* se detectó por primera vez en Italia en Lombardía y Piamonte (Rossi y Bertaglia, 1989) y más tarde en Basilicata (sur de Italia) (Lia *et al.*, 2000). Se realizaron estudios de prevalencia en perros del norte y también de algunas regiones del sur, y la prevalencia más alta se registró en el sur del país (alcanzando hasta el 60% en la población canina de algunas áreas) (Lia *et al.*, 2000; Otranto *et al.*, 2003a).

Durante un cierto período, la presencia de *T. callipaeda* en Italia se consideró un hallazgo ocasional, ya que se creía que la thelaziosis solo estaba presente en el este de Asia (Anderson, 2000). Estudios sucesivos realizados en Basilicata y en otros países de Europa demostraron que *T. callipaeda* no se limitaba al continente asiático, sino que también estaba ya muy extendida en Europa (**Fig. 18**).



**Figura 18.** Distribución de *Thelazia callipaeda* en Europa y Asia.

De hecho, la thelaziosis canina se describió poco después en Francia, en 2004 (Chermette *et al.*, 2004) y pronto el departamento francés de la Dordoña se consideró un área endémica de thelaziosis ocular (Dorchies *et al.*, 2007). El nematodo *T. callipaeda* puede haber sido introducido en Francia por la introducción de un reservorio infectado, como, por ejemplo, por un perro (o un pequeño número de perros) que pasaron tiempo en un área endémica de thelaziosis en Italia (Ruytoor *et al.*, 2010). Se baraja también la hipótesis de que la migración de zorros rojos haya contribuido a la introducción de la thelaziosis canina en esta región francesa (Dorchies *et al.*, 2007; Ruytoor *et al.*, 2010). Otra explicación podría ser la importación de liebres silvestres para cazar en Dordoña. De hecho, la introducción de liebres infectadas desde Italia ya ha sido implicada en brotes de casos animales y humanos de tularemia en Dordoña (Ruytoor *et al.*, 2010). Estudios sucesivos demostraron que la thelaziosis canina en Francia es más frecuente de lo que se pensaba porque en 2010 fueron diagnosticados 115 casos de thelaziosis canina y dos de

thelaziosis felina (Ruytoor *et al.*, 2010). Además, en una encuesta reciente, se registraron casos en 7 provincias del país (Mérindol *et al.*, 2018). Es altamente probable que la thelaziosis canina haya sido infradiagnosticada durante mucho tiempo en este y otros países europeos, al tratarse de una enfermedad subclínica en las primeras fases de la infección.

El mismo año (2004) se describieron los primeros casos en Alemania (Malacrida *et al.*, 2008; Magnis *et al.*, 2009; Lebedewa *et al.*, 2020). En un primer momento, se asoció con viajes a una región endémica de Italia (Hermosilla *et al.*, 2004) o a la cercanía con la frontera francesa en el sur de Alemania (Magnis *et al.*, 2009). Recientemente se han descrito dos casos de thelaziosis canina en animales que no habían viajado a regiones endémicas de *T. callipaeda*, lo que plantea la hipótesis de una transmisión local de la infección (Lebedewa *et al.*, 2020; Kregel-Weber *et al.*, 2021).

En Holanda y en Bélgica, en el mismo periodo, se denunció la infección en perros que habían viajado a Francia o a otras zonas endémicas (Otranto *et al.*, 2005c; Janssens y Clarebout, 2006; Caron *et al.*, 2013).

Poco después, en Suiza se registraron prevalencias de la infección del 5,3% en la población canina (Malacrida *et al.*, 2008). El cantón Ticino, en el sur de Suiza, es el área donde se han descrito la totalidad de estos casos y se sitúa en latitudes similares a la región de Piamonte (Italia) y al departamento de Dordoña (Francia) (Malacrida *et al.*, 2008). La presencia de *P. variegata* también ha sido registrada en varias partes del país (Malacrida *et al.*, 2008; Roggero *et al.*, 2010).

En España, el primer caso autóctono de thelaziosis ocular se describió en 2010 (Guisado y Sanz, 2010). La difusión de la thelaziosis en nuestro país se tratará en el siguiente apartado 2.2.3.1.

La expansión occidental de esta parasitosis en los años sucesivos en el continente europeo permitió en 2012 que se denunciaran los primeros casos autóctonos en Portugal. La mayoría de los casos se describieron en el norte (municipios de Bragança, Chaves, Macedo de Cavaleiros, Vila Real, Vinhais, Montalegre) y en las regiones del centro de Portugal (municipios de Coimbra, Sabugal, Fundão, Covilhã) (Vieira *et al.*, 2012; Pimenta *et al.*, 2013), con una prevalencia del 3,8% en la población canina (Maia *et al.*, 2016). La introducción del “verme ocular” en Portugal podría deberse a la llegada de

perros de caza de regiones endémicas durante la temporada de caza y al movimiento de emigrantes portugueses (que viven en el extranjero y vuelven a Portugal de vacaciones) y turistas con sus mascotas desde países con áreas endémicas de *T. callipaeda*, como Francia y Suiza (Sargo *et al.*, 2014) o España.

A partir del 2014, se han ido detectando cada vez más casos de thelaziosis canina en muchos países del este de Europa, entre los cuales se encuentran: Croacia (Hodžić *et al.*, 2014), Rumania (Mihalca *et al.*, 2015; Ioniță *et al.*, 2016; Tudor *et al.*, 2016a; Dumitrache *et al.*, 2018), Hungría y Bulgaria (Colella *et al.*, 2016a; Farkas *et al.*, 2018), Bosnia y Herzegovina y Serbia (Gajić *et al.*, 2014; Hodžić *et al.*, 2014). En Serbia se describieron prevalencias de entre un 21,68% y un 47,50% (Hadži-Milić *et al.*, 2016). Sin embargo, no se ha descrito todavía la presencia de *P. variegata* en Serbia y en otros de estos países donde sí se han descrito casos autóctonos, como en Grecia (Papadopoulos *et al.*, 2017).

Hasta ahora, el límite oriental del área de distribución de *T. callipaeda* en Europa está definido por los casos registrados en Grecia (Diakou *et al.*, 2015; Papadopoulos *et al.*, 2017), Turquía (Eser *et al.*, 2018; Külekçi *et al.*, 2020), Bulgaria (Colella *et al.*, 2016a; Farkas *et al.*, 2018), Rumanía (Mihalca *et al.*, 2015; Tudor *et al.*, 2016a; Dumitrache *et al.*, 2018), Eslovaquia (Čabanová *et al.*, 2017) y, más recientemente, en la República de Moldavia (Dumitrache *et al.*, 2019).

En 2016, se denunciaron los primeros casos autóctonos en Austria, que define el límite septentrional del área de distribución de *T. callipaeda* en Europa junto con los casos detectados poco después en Eslovaquia (Čabanová *et al.*, 2017), Republica Checa (Hofmannová *et al.*, 2019; Jirku *et al.*, 2020) y Polonia (Rolbiecki *et al.*, 2021).

Cabe destacar, que se han descrito cuatro casos de infección en Reino Unido en animales que tenían un historial de viaje reciente en países donde se sabe que la infección por *T. callipaeda* es endémica (Graham-Brown *et al.*, 2016, 2017; Hammond, 2018). Los viajes con mascotas, el comercio ilegal de mascotas o importación/exportación de perros callejeros, generalmente procedentes de regiones endémicas de Europa del Este, a menudo se han indicado como rutas eficientes para la transmisión y propagación de parásitos zoonóticos de áreas endémicas a no endémicas (Graham-Brown *et al.*, 2017; Hodžić *et al.*, 2019).

**Tabla VII.** Casos de thelaziosis y prevalencias de la infección por *Thelazia callipaeda* publicados hasta la fecha en los diferentes países de Europa y en las diferentes especies.

País	Hospedador	Nº de casos	Prevalencia	Referencia
Italia	Perro	222	23,1 – 41,8% <sup>a</sup> (21/91 - 185/443)	(Rossi y Bertaglia, 1989; Lia <i>et al.</i> , 2000; Otranto <i>et al.</i> , 2003a)
Italia	Gato	55	-	(Di Sacco <i>et al.</i> , 1995; Otranto <i>et al.</i> , 2003a, 2019; Motta <i>et al.</i> , 2012)
Italia	Zorro	83	5,1 – 49,3% (46/903 – 37/75)	(Rossi <i>et al.</i> , 2002; Otranto <i>et al.</i> , 2003a, 2009c)
Italia	Lobo	4 <sup>b</sup>	50% (1/2)	(Otranto <i>et al.</i> , 2007, 2009c)
Italia	Garduña	3	13,6% (3/22)	(Otranto <i>et al.</i> , 2009c)
Italia	Liebre	3	23,1 % (3/13)	(Otranto <i>et al.</i> , 2009c)
Italia	Gato salvaje	3	37,5% (3/8)	(Otranto <i>et al.</i> , 2009c)
Italia	Humano	3	-	(Otranto y Dutto, 2008)
Francia	Perro	120	-	(Chermette <i>et al.</i> , 2004; Dorchies <i>et al.</i> , 2007; Ruytoor <i>et al.</i> , 2010)
Francia	Gato	3	-	(Dorchies <i>et al.</i> , 2007; Ruytoor <i>et al.</i> , 2010)
Francia	Humano	1	-	(Otranto y Dutto, 2008)
Suiza	Perro	134 <sup>b</sup>	5,3% (28/529)	(Malacrida <i>et al.</i> , 2008)
Suiza	Gato	33 <sup>b</sup>	0,8% (17/2171)	(Malacrida <i>et al.</i> , 2008; Motta <i>et al.</i> , 2012, 2014)
Suiza	Zorro	7	5,6% (7/126)	(Malacrida <i>et al.</i> , 2008)
Alemania	Perro	8	-	(Hermosilla <i>et al.</i> , 2004; Magnis <i>et al.</i> , 2009; Schottstedt, 2009; Hammerich <i>et al.</i> , 2020; Lebedewa <i>et al.</i> , 2020; Silva <i>et al.</i> , 2020; Kregel-Weber <i>et al.</i> , 2021)
Alemania	Humano	1	-	(Dolff <i>et al.</i> , 2020)
Alemania	Gato	1	-	(Silva <i>et al.</i> , 2020)
Holanda	Perro	1	-	(Otranto <i>et al.</i> , 2005c)
Bélgica	Perro	3	-	(Janssens y Clarebout, 2006; Caron <i>et al.</i> , 2013)
España	Perro	1142 <sup>b</sup>	26 – 68% (23/88 - 51/75)	(Guisado y Sanz, 2010; Dacal <i>et al.</i> , 2011; Miró <i>et al.</i> , 2011; Montoya <i>et al.</i> , 2011a; Bello <i>et al.</i> , 2012; Arias <i>et al.</i> , 2013; González Jiménez <i>et al.</i> , 2013; Sánchez-Murillo <i>et al.</i> , 2013; Loscertales y Bonilla, 2014; Marino <i>et al.</i> , 2020)
España	Gato	69 <sup>b</sup>	3,7 – 40% (2/54 – 8/20)	(Montoya <i>et al.</i> , 2011b; Hernández L. <i>et al.</i> , 2012a; Marino <i>et al.</i> , 2020)
España	Zorro	38 <sup>b</sup>	2,2 - 8,8% (2/91 - 34/385)	(Calero-Bernal <i>et al.</i> , 2014; López-Beceiro <i>et al.</i> , 2017; Hernández I.A. <i>et al.</i> , 2019)

<b>España</b>	Lobo	2	-	(Marino et al., 2018b; Nájera et al., 2020)
<b>España</b>	Humano	6	-	(Fuentes et al., 2012; Gomez-Couso et al., 2013; López Medrano et al., 2015; Deltell et al., 2019; Martínez-Sánchez et al., 2021)
<b>España</b>	Conejo	2	-	Marino et al., 2021c
<b>Portugal</b>	Perro	42 <sup>b</sup>	3,9% (22/568)	(Vieira et al., 2012; Pimenta et al., 2013; Maia et al., 2016)
<b>Portugal</b>	Gato	6 <sup>b</sup>	23,5 % (4/17)	(Rodrigues et al., 2012; Soares et al., 2013; Maia et al., 2016)
<b>Portugal</b>	Zorro	3	-	(Sargo et al., 2014)
<b>Portugal</b>	Garduña	1	-	(Seixas et al., 2018)
<b>Portugal</b>	Conejo	2	-	(Gama et al., 2016)
<b>Bosnia y Herzegovina</b>	Perro	4	-	(Hodžić et al., 2014)
<b>Bosnia y Herzegovina</b>	Gato	1	-	(Hodžić et al., 2014)
<b>Bosnia y Herzegovina</b>	Zorro	51	27,7% (51/184) <sup>c</sup>	(Hodžić et al., 2014)
<b>Croacia</b>	Perro	2	-	(Hodžić et al., 2014)
<b>Croacia</b>	Humano	1	-	(Paradžik et al., 2016)
<b>Serbia</b>	Perro	184	22 – 48%	(Gajić et al., 2014; Hadži-Milić et al., 2016; Tasić-Otašević et al., 2016)
<b>Serbia</b>	Gato	2	-	(Gajić et al., 2014)
<b>Serbia</b>	Humano	1	-	(Tasić-Otašević et al., 2016)
<b>Serbia</b>	Zorro	3	-	(Pavlovic et al., 2017)
<b>Serbia</b>	Lobo	8	38,1% (8/21)	(Gajić et al., 2019)
<b>Grecia</b>	Perro	47	-	(Diakou et al., 2015; Papadopoulos et al., 2017)
<b>Grecia</b>	Gato	3	-	(Papadopoulos et al., 2017)
<b>Grecia</b>	Conejo	1	-	(Papadopoulos et al., 2017)
<b>Rumanía</b>	Perro	18	-	(Mihalca et al., 2015; Ioniță et al., 2016; Tudor et al., 2016a; Tudor y Ionascu, 2017; Dumitrache et al., 2018)
<b>Rumanía</b>	Lobo	1	-	(Mihalca et al., 2016)
<b>Rumanía</b>	Chacal dorado	1	-	(Mihalca et al., 2016)
<b>Rumanía</b>	Gato salvaje	1	-	(Mihalca et al., 2016)
<b>Rumanía</b>	Gato	1	-	(Dumitrache et al., 2018)
<b>Rumanía</b>	Zorro	151	29,4% (151/514) <sup>d</sup>	(Ionică et al., 2018)
<b>Rumanía</b>	Tejón	1	1,8% (1/55)	(Ionică et al., 2019)
<b>Rumanía</b>	Garduña	1	7,7% (1/13)	(Ionică et al., 2019)

<b>Hungría</b>	Perro	11	-	(Colella <i>et al.</i> , 2016a; Farkas <i>et al.</i> , 2018)
<b>Hungría</b>	Gato	1	-	(Farkas <i>et al.</i> , 2018)
<b>Bulgaria</b>	Perro	9	-	(Colella <i>et al.</i> , 2016a)
<b>Reino Unido</b>	Perros	4	-	(Graham-Brown <i>et al.</i> , 2016, 2017; Hammond, 2018)
<b>Austria</b>	Perro	1	-	(Hinney <i>et al.</i> , 2016)
<b>Austria</b>	Gato	1	-	(Hodžić <i>et al.</i> , 2019)
<b>Eslovaquia</b>	Perro	4	-	(Čabanová <i>et al.</i> , 2017)
<b>Eslovaquia</b>	Zorro	7	1,3% (7/523)	(Čabanová <i>et al.</i> , 2018)
<b>Turquía</b>	Perro	2	-	(Eser <i>et al.</i> , 2018; Kilekçi <i>et al.</i> , 2020)
<b>República Checa</b>	Perro	3	-	(Hofmannová <i>et al.</i> , 2019; Jirku <i>et al.</i> , 2020)
<b>República de Moldavia</b>	Perro	1	-	(Dumitrache <i>et al.</i> , 2019)
<b>Andorra</b>	Perro	11	-	(Marino <i>et al.</i> , 2020)
<b>Polonia</b>	Perro	1	-	(Rolbiecki <i>et al.</i> , 2021)

<sup>a</sup> Por municipios la prevalencia mínima fue del 5,6% y la máxima del 60,1%

<sup>b</sup> Los casos positivos no coinciden con la prevalencia porque este número resulta de la suma de los casos positivos en el estudio de prevalencia mas los casos descritos en la literatura que no pertenecen a un estudio de prevalencia

<sup>c</sup> Por municipios la prevalencia mínima fue del 0% y la máxima del 50%

<sup>d</sup> Por municipios la prevalencia mínima fue del 12,7% y la máxima del 66,7%

Son numerosos todos los casos publicados en la literatura, hasta la fecha, en los diferentes países europeos (**Tabla VII**). Los casos autóctonos registrados se encuentran en áreas montañosas, en un entorno rural donde a menudo hay perros de caza y/o callejeros, lo que hace que estas zonas presenten las características adecuadas para la presencia del vector. Las latitudes descritas en Europa se encuentran dentro de las descritas en los países asiáticos (es decir, entre 10° y 45° Norte) donde la thelaziosis humana y canina lleva presente mucho tiempo (Hodžić *et al.*, 2014).

### 2.2.3.1. Análisis de la emergencia de la infección por *Thelazia callipaeda* en España

En España, el primer caso autóctono de thelaziosis ocular se describió en 2010 en un perro en Sevilla que había pasado algunas semanas en la región de la Vera (provincia de Cáceres) (Guisado y Sanz, 2010; Loscertales y Bonilla, 2014). Posteriormente nuestro equipo de investigación describió los primeros casos autóctonos en la misma zona norte

de Extremadura (región de la Vera) (Montoya *et al.*, 2011a), considerándose esta área geográfica el foco principal y el origen de los casos detectados en España, detectándose prevalencias de hasta un 40% en la población canina (Miró *et al.*, 2011).

Se sospecha que la infección por *T. callipaeda* se introdujo inicialmente en España a través de perros de caza de Italia (es un destino frecuente para cazadores italianos) y/o animales de compañía que viajaban desde Francia (es una región elegida muy a menudo por los turistas franceses), siendo ambos países endémicos en ese momento (Miró *et al.*, 2011). Esta área se encuentra en el rango del modelo geoclimático para la distribución de *P. variegata* (Otranto *et al.*, 2006a; Miró *et al.*, 2011) y también representa un hábitat ideal por su vegetación para la presencia del vector.

Desde los informes iniciales de esta infección en perros, el número de casos ha aumentado considerablemente en muchas regiones de España, especialmente en las regiones occidentales (región de la Vera y provincia de Salamanca) (Montoya *et al.*, 2011a; Dacal *et al.*, 2011; Miró *et al.*, 2011; González Jiménez *et al.*, 2013), incluyendo la cercana provincia de Badajóz (Sánchez-Murillo *et al.*, 2013). Además, se describió un segundo foco endémico de la infección en la provincia de Orense (Bello *et al.*, 2012), adyacente a la frontera norte de Portugal, y posteriormente otros tres casos autóctonos procedentes de Galicia (Arias *et al.*, 2013).

Ulteriores resultados sobre la dispersión de *T. callipaeda* en España están recogidos en la sección de resultados de esta memoria; por tanto, los sucesivos focos de infección que se han detectado en los municipios de El Escorial y de Miraflores de la Sierra no se describen en este apartado.

#### **2.2.4. Expansión geográfica de la thelaziosis felina en Europa**

El perro es sin duda el principal reservorio del ciclo doméstico de la infección por *T. callipaeda* (Otranto y Deplazes, 2019), mientras que la especie felina parece actuar como reservorio alternativo.

Desde la primera denuncia de *T. callipaeda* en Europa han pasado poco más de 30 años y, desde entonces, la literatura ha descrito muy pocos casos de infección en gatos

si los comparamos con todos los descritos en la especie canina (**Tabla VII** del apartado 2.2.2. de esta sección). Los informes de thelaziosis felina son en su mayoría casos aislados pero el papel del gato en la circulación del parásito puede ser solo aparentemente menor que el del perro (Tosco *et al.*, 2010; Motta *et al.*, 2014). En la primera fase de infección o en infecciones causadas por un bajo número o por parásitos de un solo sexo, los gatos a menudo no muestran signos clínicos y, por lo tanto, la infección puede pasar desapercibida por propietarios y veterinarios (Malacrida *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2014).

Se cree que la población felina puede actuar como reservorio alternativo del parásito en áreas donde la presencia de *Dirofilaria immitis* induce a los dueños de perros a usar tratamientos preventivos, a menudo muy efectivos también frente a *T. callipaeda* (Tosco *et al.*, 2010), ya que, a diferencia de la especie canina, no se suele usar esta medida preventiva en los gatos.

La prevalencia significativamente menor en perros de raza pequeña y el bajo número de casos en gatos puede ser debida a su pequeña masa corporal y, por lo tanto, a ser menos atractivos para las moscas (Motta *et al.*, 2014), probablemente porque se corresponde con un menor tamaño de los ojos y de las estructuras oculares, principal ubicación de esta parasitosis. Otra explicación es que tanto los perros de razas pequeñas, como los gatos, suelen vivir en el interior de los hogares, lo cual reduce el tiempo de exposición al vector. Además, los gatos por sus hábitos de limpieza generalmente eliminan las secreciones oculares que son muy atractivas para los vectores. El candidato óptimo sería un gato que viva principalmente al aire libre, donde se cumplen las condiciones ideales para la presencia del vector, y donde haya elevadas prevalencias de infección en los perros (Rodrigues *et al.*, 2012; Motta *et al.*, 2014).

Los primeros casos de thelaziosis felina en Europa se describieron en Milán y en Turín, en el norte de Italia (Di Sacco *et al.*, 1995; Otranto *et al.*, 2003a), después del diagnóstico de los casos en la población canina de la misma zona (Rossi y Bertaglia, 1989).

A día de hoy, en Francia, principalmente en Dordoña, donde la thelaziosis canina se considera endémica, se han registrado tres casos en gatos (Dorchies *et al.*, 2007; Ruytoor *et al.*, 2010); mientras en Suiza, después de los primeros casos aislados (n=5)

(Malacrida *et al.*, 2008), un estudio reportó una prevalencia del 0,8% de thelaziosis felina en el Cantón Ticino (Motta *et al.*, 2014).

En España, los primeros casos de infección en gatos se observaron en las mismas localizaciones donde se habían denunciado los primeros casos de thelaziosis canina (Montoya *et al.*, 2011b); detectándose en 27 gatos, de los cuales, 17 procedían de Cáceres, 8 de Ávila, uno de Asturias y uno de Ibiza (Hernández L. *et al.*, 2012a). No obstante, cabe resaltar que el gato muestreado en Asturias había pasado un periodo estival en Orense, y el de Ibiza en Cáceres; ambas zonas endémicas de thelaziosis canina en España (Hernández L. *et al.*, 2012a).

Nuevamente, ulteriores datos sobre la difusión de la thelaziosis felina en España se detallarán en la sección de resultados de esta memoria.

En Portugal, en un estudio reciente realizado en 7 municipios del centro-este de Portugal, se describió una prevalencia del 23,5% (4/17) (Maia *et al.*, 2016). Estudios previos ya habían registrado la presencia de thelaziosis felina en este país (Rodrigues *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013).

Paralelamente al aumento del número de registros de thelaziosis canina en muchos países del este de Europa, se empezaron a describir casos en la población felina de la zona: dos en Serbia (Gajić *et al.*, 2014), uno en Bosnia y Herzegovina (Hodžić *et al.*, 2014), tres en Grecia (Papadopoulos *et al.*, 2017), uno en Rumanía (Dumitrache *et al.*, 2018) y uno en Hungría (Farkas *et al.*, 2018).

El límite septentrional del área de distribución de *T. callipaeda* en gatos en Europa está de momento definido por los casos autóctonos registrados en Austria (Hodžić *et al.*, 2019). En Alemania también se describió recientemente un caso de infección en un gato que procedía del Sur de España (Silva *et al.*, 2020).

### **2.2.5. Reservorios**

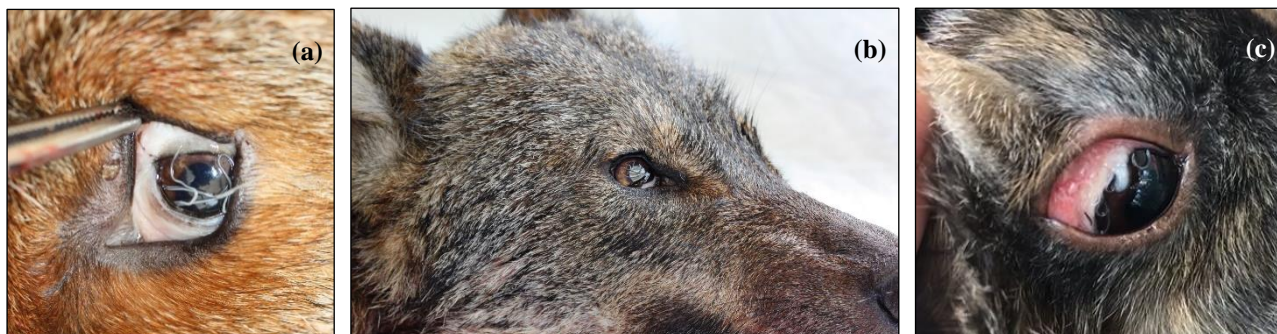
Existe también un ciclo silvestre de la infección por *T. callipaeda* mantenido por varias especies de carnívoros silvestres como: zorro (*Vulpes vulpes*), lobo (*Canis lupus*), garduña (*Martes foina*), gato salvaje (*Felis silvestris*), tejón (*Meles meles*), chachal (*Canis*

*aureus*), y lagomorfos como: conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y liebres (*Lepus europaeus*) (Rossi *et al.*, 2002; Otranto *et al.*, 2007, 2009c; Gama *et al.*, 2016; Mihalca *et al.*, 2016; Ionică *et al.*, 2019). En Rusia, la infección por *T. callipaeda* se describió también en marta cibelina (*Martes zibellina*), mapache japonés (*Nyctereutes procyonoides*), oso tibetano (*Ursus thibetanus*) y lince boreal (*Lynx lynx*) (Odoyevskaya *et al.*, 2015). En esta última especie se había descrito anteriormente un caso en un zoo de Japón (El-Dakhly *et al.*, 2012). Recientemente, en China se ha descrito la infección en un oso panda (*Ailuropoda melanoleuca*), un jabalí (*Sus scrofa*), un gato de Bengala (*Prionailurus bengalensis*) y un oso negro (*Ursus americanus*) (Yipeng *et al.*, 2020), ampliando el rango de hospedadores afectados por esta parasitosis.

El hallazgo de vermes adultos de *T. callipaeda* en los ojos de especies silvestres indica su competencia como hospedadores definitivos de este parásito, ya que implica que las larvas de tercer estadio, liberadas por el hospedador intermediario, son capaces de desarrollarse hasta adultos en su cavidad ocular. Desde un punto de vista parasitológico, estos resultados son interesantes porque *T. callipaeda* tiene el espectro más amplio de hospedadores definitivos entre las especies de *Thelazia*; mientras que por ejemplo *T. lacrymalis* parasita solo a caballos, *T. rhodesi* y *T. gulosa* infectan principalmente a los rumiantes (Anderson, 2000). *T. callipaeda* tiene una mayor versatilidad, como demuestran las pruebas experimentales realizadas en perros, gatos, conejos y monos (Faust, 1928). La imposibilidad de infectar experimentalmente algunas especies de animales se ha relacionado con la composición bioquímica de las secreciones lacrimales o con las características anatómicas del ojo (Faust, 1928). Las ovejas y las cabras, aunque presentan una membrana nictitante, no son hospedadores apropiados para *T. callipaeda*, mientras que el hombre y el mono, incluso sin tener un tercer párpado, son hospedadores adecuados para este nematodo (Faust, 1928). Los estudios realizados en *T. rhodesi* confirman la importancia de la composición química de la secreción lacrimal para este nematodo ocular, de hecho, está presente en numerosos rumiantes, pero totalmente ausente en carnívoros (Yamaguti, 1961).

En España se ha denunciado la infección por *T. callipaeda* en carnívoros silvestres tales como zorros (**Fig. 19a**) (Calero-Bernal *et al.*, 2014; López-Beceiro *et al.*, 2017; Hernández I.A. *et al.*, 2019), lobos (**Fig. 19b**) (Marino *et al.*, 2018b; Nájera *et al.*, 2020) y dos conejos (**Fig. 19c**) (Marino *et al.*, 2021c, ANEXO XV). En zorros se reportó una

prevalencia mínima del 2,2% (2/91) en animales procedentes de las provincias de Murcia y Alicante (Hernández I.A. *et al.*, 2019) y una prevalencia del 8,83% (34/385) en 9 municipios, ubicados en la provincia de Lugo (6) y Ourense (3) (López-Beceiro *et al.*, 2017).



**Figura 19.** Infección por vermes adultos de *Thelazia callipaeda* en mamíferos silvestres. **19a.** Zorro (*Vulpes vulpes*). Cortesía: Profesora Ana María López Beceiro. Facultad de Veterinaria de Lugo USC. **19b.** Lobo (*Canis lupus*). Cortesía: Profesora Ana María López Beceiro. Facultad de Veterinaria de Lugo USC. **19c.** Conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

En el apartado 2.2.3. hemos señalado que la introducción, el mantenimiento y la propagación de la infección por *T. callipaeda* en países europeos previamente no endémicos se ha atribuido, en muchos casos, a varias especies de vida silvestre (Hermosilla *et al.*, 2004; Malacrida *et al.*, 2008; Otranto *et al.*, 2009c; Miró *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2012; Hodžić *et al.*, 2014; Otranto y Dantas-Torres, 2015; Mihalca *et al.*, 2016; Papadopoulos *et al.*, 2017; Hodžić *et al.*, 2019; Otranto y Deplazes, 2019). Un cierto grado de actividad diurna entre los mamíferos silvestres, particularmente en la temporada de verano cuando está presente *P. variegata*, explica la potencial exposición de los mismos a la infección por *T. callipaeda* (Otranto *et al.*, 2009c). Dado que los cánidos salvajes (es decir, zorros, garduñas, lobos, chacales) y los felinos silvestres (gato montés) viven en bosques, áreas montañosas (por ejemplo, alrededor de bosques de roble) y en ambientes caracterizados por alta humedad relativa (por ejemplo, alrededor ríos) y maleza, expuestos al vector (Otranto *et al.*, 2006a). Por lo tanto, las especies silvestres pueden ser hospedadores adecuados para *T. callipaeda* en áreas endémicas y no endémicas (Mihalca *et al.*, 2016), como el Reino Unido, donde, hasta ahora, solo se han notificado casos importados de thelaziosis canina (Graham-Brown *et al.*, 2017) aunque el vector sea endémico (Palfreyman *et al.*, 2018).

El zorro podría ser el eslabón entre el ciclo doméstico y el ciclo silvestre por su preferencia a vivir cerca de las poblaciones humanas, pudiendo actuar como reservorio secundario (Ruytoor *et al.*, 2010; Otranto *et al.*, 2015). Además, el hecho de que los zorros adultos del mismo sexo estén separados entre sí dentro de su territorio (que puede variar de 10 a 30 km) puede facilitar la expansión de la infección a las regiones vecinas (Niewold, 1980; Doncaster y Macdonald, 1991; Hodžić *et al.*, 2014). La importancia de los cánidos silvestres y la existencia de un ciclo silvestre de *T. callipaeda*, independientemente de la presencia de perros, se confirma por la alta prevalencia de infección (por ejemplo, 27,7%) registrada en zorros en áreas donde la infección en la especie canina aún no se había descrito (Hodžić *et al.*, 2014). La prevalencia en zorros puede alcanzar el 49,3% (Otranto *et al.*, 2009c) en áreas altamente endémicas, donde la infección está bien establecida en poblaciones de perros y gatos (Otranto *et al.*, 2015), como es el caso de Italia.

Por lo tanto, los zorros pueden haber jugado un papel en la propagación de la thelaziosis migrando a través de los Alpes en áreas previamente no endémicas donde el vector estaba presente (Dorchies *et al.*, 2007; Ruytoor *et al.*, 2010; Hodžić *et al.*, 2014; Otranto *et al.*, 2015).

Las consideraciones ecológicas mencionadas están respaldadas por datos moleculares sobre la aparición de un solo haplotipo (es decir, h1) de *T. callipaeda* en diferentes especies de hospedadores (Otranto *et al.*, 2005c). Se encontró el mismo h1 en otros países europeos, independientemente de la especie de hospedador de la que los parásitos fueron recolectados (Otranto *et al.*, 2005c). Los hallazgos moleculares y los estudios sobre *P. variegata* indican un alto nivel de afinidad del nematodo por su vector (Otranto *et al.*, 2005a, 2005c, 2006b) y un bajo grado de especificidad por los hospedadores definitivos (Otranto *et al.*, 2009c).

El papel de otros carnívoros silvestres, como el lobo, como posible reservorio y propagador de la thelaziosis podría ser crucial (Otranto *et al.*, 2007; Gajić *et al.*, 2019) ya que, a diferencia del zorro, ocupa vastos territorios (incluso más de 800 km) y deja la manada cuando alcanza la edad reproductiva (22-24 meses) para buscar un nuevo territorio (Mech, 1970). No obstante, aunque en los últimos años se están llevando a cabo medidas para evitar su extinción, el lobo es una especie de la que no quedan muchos ejemplares, lo cual reduce su potencial riesgo como transmisor de esta parasitosis.

### 2.2.6. Factores de riesgo

En los estudios epidemiológicos realizados, se han descrito una serie de factores asociados al hospedador que parecen aumentar las probabilidades de contraer la infección, entre los que se encuentran la aptitud, el hábitat, la raza, la edad y el sexo. Estos factores se han estudiado principalmente en la especie canina, siendo escasos los estudios realizados en la especie felina.

La **aptitud** representa un factor de riesgo ya que los perros utilizados en actividades de pastoreo o guarda, pasan periodos de tiempo más largos en el exterior y están, por lo tanto, más tiempos expuestos a las moscas (Malacrida *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011; Calero-Bernal *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2016; Do Vale *et al.*, 2019). Este hecho también está relacionado con la **raza** y el **tamaño** del animal, siendo los perros de talla media/grande más frecuentemente usados en estos tipos de actividades y, en consecuencia, se describen tasas de prevalencia más bajas en razas de tamaño pequeño (Dorchies *et al.*, 2007; Malacrida *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011; do Vale *et al.*, 2019, 2020). Del mismo modo, la detección de parásitos parece ser mayor en los perros que conviven con otros animales (perros, gatos, ganado vacuno y/o aves de corral), debido a una mayor presencia de *P. variegata* en los lugares con un mayor número de hospedadores (Maia *et al.*, 2016).

En cuanto al **hábitat**, se ha descrito que los perros/gatos que viven en zonas rurales o periurbanas, donde son frecuentes las viviendas con patios, jardines y/o granjas en cuyos alrededores abundan perros, tienen más riesgo de adquirir la infección (Dorchies *et al.*, 2007; Otranto *et al.*, 2007; Tosco *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2016). La vegetación también se ha asociado con la presencia de animales positivos (debido a la asociación con el vector) (Otranto *et al.*, 2003a; Miró *et al.*, 2011; Hodžić *et al.*, 2014; Papadopoulos *et al.*, 2017).

La **edad** parece ser un factor de riesgo, de hecho, se describieron prevalencias menores en perros jóvenes (1-3 años) (Dorchies *et al.*, 2007; Malacrida *et al.*, 2008) y gatos menores de 2 años (Tosco *et al.*, 2010). Un análisis reciente sobre los estudios realizados en perros, gatos y zorros rojos, demuestra que el grupo de edad correspondiente al periodo entre 1 y 8 años es el más afectado (do Vale *et al.*, 2020). Este resultado está en consonancia con lo observado en gatos (Motta *et al.*, 2014). Sin embargo, otros autores

no han descrito diferencias significativas en los animales infectados en relación con la edad (Otranto *et al.*, 2003a; Miró *et al.*, 2011).

El **sexo** por lo general no se considera un factor determinante y en perros se observaron resultados contradictorios sobre la predisposición sexual (Otranto *et al.*, 2003a; Malacrida *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011). Por otro lado, Do Vale *et al.* (2020) estudiaron que los machos se infectaron con más frecuencia que las hembras (perros:  $p = 0,0365$ ; gatos:  $p = 0,0164$ ; zorros rojos:  $p = 0,0082$ ). En el caso de los gatos, esto ha sido descrito por otros autores y se podría suponer que los machos tienen un mayor riesgo de infección por *T. callipaeda*, posiblemente debido a un tiempo al aire libre más prolongado para la caza y el comportamiento territorial (Finkler *et al.*, 2011; Loyd *et al.*, 2013), lo que los lleva a un mayor riesgo de infección (Motta *et al.*, 2014).

Asimismo, podemos argumentar que estas drosófilas, debido a sus preferencias de alimentación, son especialmente atraídas por los ojos con secreción ocular, que a menudo aumenta en animales con **lesiones oculares** (Motta *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2016).

La presencia de drosófilas infectadas con larvas de *T. callipaeda* claramente constituye el principal factor de riesgo en la incidencia de la thelaziosis (Otranto *et al.*, 2006b; Roggero *et al.*, 2010).

Existen una serie de factores asociados al vector que favorecen el riesgo de transmisión de la infección, entre los que se encuentran factores climáticos (temperatura ambiente, humedad, viento), abundancia de materia orgánica en descomposición o fermentación (la mayoría de las drosófilas se han adaptado a alimentarse de sustratos ricos en bacterias, levaduras y otros hongos), y la presencia de reservorios por sus hábitos alimentarios diferentes ya que pueden alimentarse de tejidos o secreciones lacrimales (Ashburner *et al.*, 2005; Máca y Otranto, 2014).

### **2.2.7. Impacto en Salud Pública**

*T. callipaeda*, *T. californiensis* y *T. gulosa* son los agentes etiológicos que causan la thelaziosis humana. El primero, se ha registrado en personas en varios países asiáticos y, últimamente, también en Europa (Anderson, 2000; Shen *et al.*, 2006; Otranto y Eberhard, 2011; Do Vale *et al.*, 2019). Hay pocos datos en la literatura sobre la infección

causada por *T. californiensis* con tan solo 10 casos descritos en personas. Nueve de ellos se localizan en California, particularmente en las montañas de Sierra Nevada y uno en Utah (Doezie *et al.*, 1996; Bradbury *et al.*, 2020). Solo existe un caso documentado en el que los nematodos adultos de *T. californiensis* fueron morfológica y genéticamente diagnosticados en un paciente suizo después de una estancia en el norte de California (Otranto y Deplazes, 2019). Por lo que sabemos, recientemente se han descrito los primeros dos casos de infección causada por *T. gulosa* en personas. El primer caso, adquirido en Oregón en 2016 (Bradbury *et al.*, 2018) y el segundo en una mujer residente en Nebraska, que había pasado el invierno en California (Bradbury *et al.*, 2020).

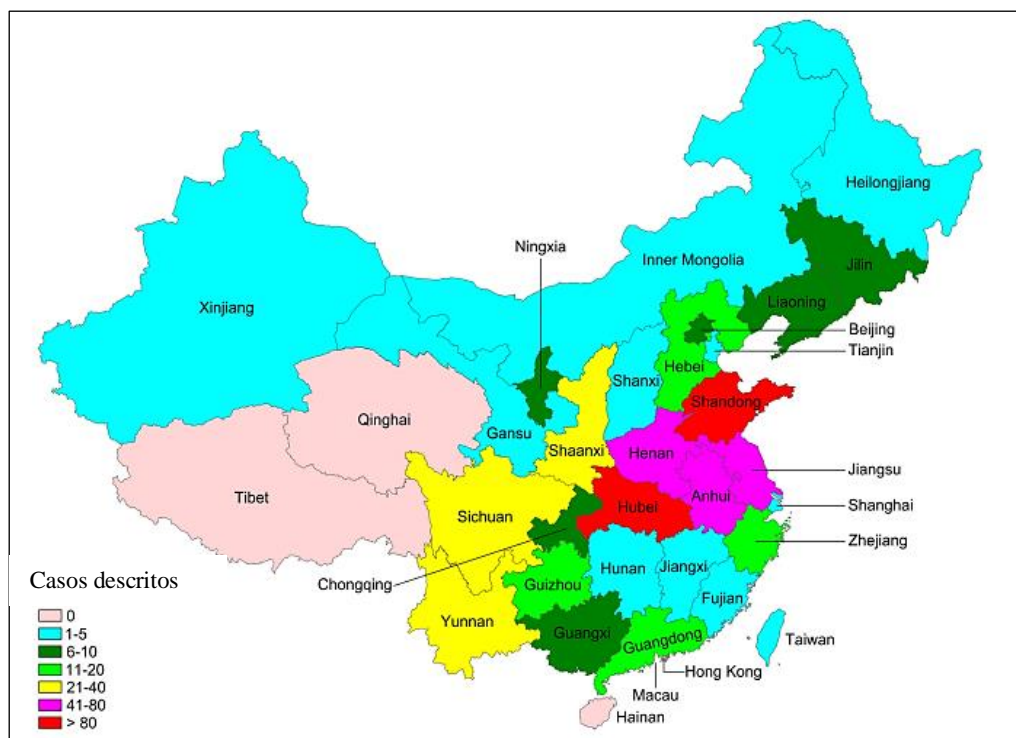
*T. callipaeda* representa un ejemplo de enfermedad emergente (Colella *et al.*, 2016), un helminto que infecta los ojos (HIE: helminth infecting eyes) que se está extendiendo y es nuevo para la comunidad científica en los países occidentales (Otranto y Eberhard, 2011). Junto con *T. californiensis* y ahora *T. gulosa*, *T. callipaeda* es el único helminto transmitido por moscas secretófagas directamente a la órbita ocular de los humanos (Otranto y Traversa, 2005). La thelaziosis humana se considera además una enfermedad parasitaria infradiagnósticada, cuya prevalencia parece haber aumentado en entornos socioeconómicos pobres en muchos países asiáticos. El conocimiento sobre la thelaziosis humana actualmente es fragmentario y se limita principalmente a los informes de casos clínicos (Shen *et al.*, 2006).

El primer caso descrito de thelaziosis humana fue en Beijing, China (Stuckey, 1917). En los años siguientes, este nematodo se ha denunciado cada vez más en la antigua Unión Soviética (Miróshnichenko *et al.*, 1988) y el continente asiático, incluida China (Shi *et al.*, 1988; Zakir *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2006; S. Wang *et al.*, 2014), Corea (Hong *et al.*, 1981; Seo *et al.*, 2002; Sohn *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013), Japón (Okamura *et al.*, 1967; Koyama *et al.*, 2000), Indonesia (Kosin *et al.*, 1989), Tailandia (Bhaibulaya *et al.*, 1970; Viriyavejakul *et al.*, 2012), Taiwán (Yang *et al.*, 2006), India (Singh y Singh, 1993; Sharma *et al.*, 2006), Bangladesh (Hossain *et al.*, 2011; Akhanda *et al.*, 2013), Vietnam (De *et al.*, 2012) y Nepal (Sah *et al.*, 2018).

La thelaziosis humana ocurre mayoritariamente en zonas rurales con escasas condiciones económicas y afecta principalmente a niños de entre tres y seis años y personas de avanzada edad, quienes pueden ser menos capaces de mantener a las moscas fuera de su alcance (Shen *et al.*, 2006; S. Wang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020). Además, se

ha registrado un mayor número de casos en zonas con elevadas prevalencias en la población canina y/o de otros animales como gatos y zorros (Shen *et al.*, 2006).

La aparición de la thelaziosis humana se ha relacionado también con la estación del año: en China, el 74% de los casos ocurren en verano y otoño, cuando las moscas son abundantes (Otranto y Traversa, 2005). Parece ser que el número de casos y la relevancia de la thelaziosis humana han aumentado en China en las últimas 3 décadas. De hecho, entre 1917 y 1949, se habían descrito tan solo 10 casos, pero el número de casos se elevó a 162 a finales de la década de 1970 y, posteriormente, se describieron alrededor de 246 casos de thelaziosis humana en 21 provincias hasta 1990 (Shen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2020). En octubre de 2005, se notificaron un total de 371 nuevos casos (Shen *et al.*, 2006) y, hasta la fecha, se han registrado un total de 653 casos de thelaziosis humana distribuidos en 28 de las 34 provincias, regiones autónomas o municipios de China (**Fig. 20**) (S. Wang *et al.*, 2014; X.-L. Wang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020).



**Figura 20.** Distribución geográfica de los casos de thelaziosis humana en China. Fuente: Liu *et al.*, 2020.

Hasta la fecha, no se han realizado estudios de prevalencia para evaluar el impacto de la thelaziosis humana en regiones endémicas. Además, se ha prestado poca atención a la difusión de la enfermedad y, por lo tanto, su importancia probablemente se subestima (Shen *et al.*, 2006). La razón de esto puede ser que la mayoría de la literatura sobre el tema ha sido publicada en idiomas diferentes del inglés (principalmente chino, ruso o coreano) y no ha sido accesible a gran parte de la comunidad científica internacional (Otranto *et al.*, 2003a; Shen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2020).

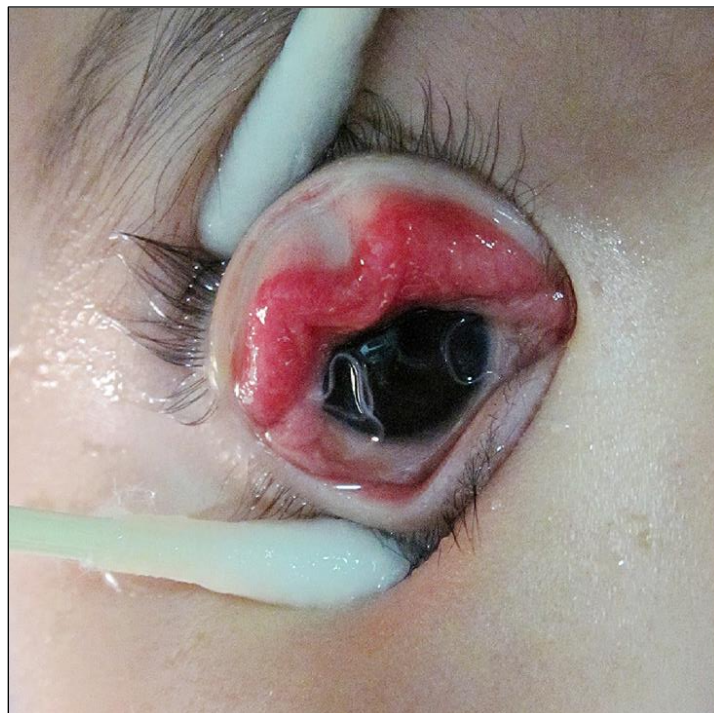
A pesar de las altas prevalencias de thelaziosis en la especie canina o en otras especies silvestres en algunos países de Europa (Otranto *et al.*, 2003a; Malacrida *et al.*, 2008; Otranto *et al.*, 2009c; Miró *et al.*, 2011; Hodžić *et al.*, 2014; Hadži-Milić *et al.*, 2016; Maia *et al.*, 2016), solo se han descrito por ahora algunos casos de infección en humanos (**Tabla VII** del apartado 2.2.3. de esta sección), probablemente debido a la limitada información en la literatura sobre la thelaziosis humana o la dificultad para diferenciarla de una conjuntivitis bacteriana o alérgica en las temporadas de primavera y verano especialmente cuando es causada por estadios larvarios (Otranto y Dutto, 2008). Los primeros casos de thelaziosis humana en Europa se describieron en Italia y en Francia, en la misma zona donde ya se había descrito la presencia de la thelaziosis canina (Otranto y Dutto, 2008). Entre junio de 2005 y agosto de 2006, se describieron 3 casos en personas que vivían en el noroeste de Italia (Liguria y Piadmonte) y uno en el sur de Francia (Niza) (Otranto y Dutto, 2008).

Poco después, se registraron los primeros casos en España: el primero en una niña de 17 años que veraneaba en Cáceres (zona endémica por la thelaziosis canina) (Fuentes *et al.*, 2012), posteriormente otro caso en Orense en un hombre de 86 años que vivía en un área rural (Gómez-Couso *et al.*, 2013), y un tercero en El Bierzo (provincia de León) en un varón de 24 años que describía una sensación de cuerpo extraño en el ojo derecho, acompañada de epífora (López Medrano *et al.*, 2015). Recientemente, se han diagnosticado dos casos más en Orense en dos pacientes de 65 y 66 años que presentaban varios días de evolución consistente en lagrimeo constante y sensación de cuerpo extraño en el ojo (Deltell *et al.*, 2019). Asimismo, un sexto caso fue diagnosticado en una mujer de 81 años de Alcalá de Henares (Madrid), que presentaba un historial de una semana de conjuntivitis, fotofobia y lagrimeo que no habían mejorado a pesar de los antibióticos y el tratamiento tópico con corticosteroides. La paciente había veraneado unas semanas

antes en El tornadizo (Salamanca), donde había estado en contacto con los perros de los vecinos, que habían presentado vermes oculares (Martínez-Sánchez *et al.*, 2021).

Otros países europeos donde se han notificado casos en humanos son Serbia (n = 1) (Tasić-Otašević *et al.*, 2016), Croacia (n = 1) (Paradžik *et al.*, 2016) y Alemania (n = 1) (Dolff *et al.*, 2020). Todos estos casos se registraron durante los meses de verano (junio-agosto) y principios de otoño, que coincide con el período de actividad de *P. variegata* (Otranto *et al.*, 2006a). Hasta donde sabemos, no se han notificado casos humanos en otros países europeos.

La mayoría de las infecciones son causadas por un bajo número de parásitos, aunque se ha descrito un caso de infección masiva causada por 36 vermes en un agricultor chino (S. Wang *et al.*, 2014). En los casos publicados en Europa, se describen los siguientes signos clínicos: lagrimeo (n = 8), sensación de cuerpo extraño (n = 7), conjuntivitis exudativa (n = 5), hiperemia conjuntival (n = 4), picor (n = 2), dolor (n = 2), fotosensibilidad (n = 2), infección conjuntival (n = 1), absceso corneal (n = 1), y congestión (n = 2) (**Fig. 21**) (Shen *et al.*, 2006; Otranto y Dutto, 2008; Fuentes *et al.*, 2012; Dolff *et al.*, 2020; do Vale *et al.*, 2020).



**Figura 21.** Ojo derecho de un niño de 3 años infectado con vermes adultos de *Thelazia callipaeda*. Fuente: S. Wang *et al.*, 2014.

La presencia de los nematodos puede determinar que las personas se froten los ojos y los síntomas se agraven por colonización bacteriana secundaria (*Pasteurella*, *Clamidia* y/o *Staphylococcus*) (Shen *et al.*, 2006).

La prevención de la thelaziosis humana debe incluir el control del vector mediante el uso de mosquiteras, y/o gafas, además de mantener una buena higiene de la cara y los ojos (Shen *et al.*, 2006; Otranto y Dutto, 2008).

Ha habido algún informe en la bibliografía de casos de infección intraocular causados por *T. callipaeda* (Zakir *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2006; Kunavisarut *et al.*, 2014) pero en ninguno de ellos el diagnóstico se confirmó por biología molecular. En Corea, por ejemplo, se identificó erróneamente como *T. callipaeda* un helminto que había causado una infección intraocular. La imagen publicada en el artículo mostraba un filarioide (Kim *et al.*, 2010). En el mismo artículo, los autores declaraban que el ciclo biológico de *T. callipaeda* no estaba claro y discutían la posibilidad de la infección en humanos a través de la piel o al beber agua no tratada. Tanto el diagnóstico parasitológico como esta hipótesis, algo inverosímil, fueron sucesivamente desmentidas por el Prof. Otranto a través de una carta enviada al editor de la revista (The Editors, Japanese Journal of Ophthalmology, 2011). En el artículo de Kunavisarut *et al.* (2014), la localización subretiniana, el tamaño y las imágenes del “nematodo” en cuestión no eran compatibles con *T. callipaeda*. Otro artículo que describe la presencia de *T. callipaeda* enquistada en el saco lacrimal de una mujer de 42 años, parece a su vez poco verídico (Das *et al.*, 2018). Como ya han denunciado otros autores (Otranto y Dantas-Torres, 2015), la información científica sobre la thelaziosis humana aún es limitada, principalmente para médicos y oftalmólogos. En efecto, la literatura científica está llena de información poco contrastada sobre la transmisión de *T. callipaeda* a los humanos.

El uso de las técnicas de biología molecular ha complementado y mejorado en gran medida el conocimiento sobre esta parasitosis (Otranto y Wall, 2008).

Las zoonosis parasitarias transmitidas por vectores tienen un impacto considerable en la salud animal y humana y los países en desarrollo siempre se encuentran entre los más desfavorecidos (Otranto *et al.*, 2009a; Colwell *et al.*, 2011). La educación y una colaboración entre veterinarios, médicos (en particular oftalmólogos) y propietarios de animales representan el primer paso para combatir la enfermedad (Otranto *et al.*, 2009b;

Colwell *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2012; Gajić *et al.*, 2014; Farkas *et al.*, 2018). El término "*One Health*" se refiere a estas relaciones existentes entre animales, humanos y el medio ambiente. Este concepto surge como una estrategia global adoptada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y aceptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el objetivo de establecer una colaboración interdisciplinar entre las autoridades nacionales y las organizaciones involucradas en la salud animal y humana. Se basa en la aplicación de prácticas relacionadas con la prevención, el control y la detección de enfermedades animales (incluidas las zoonosis), la seguridad alimentaria y otras aplicaciones en el campo de la resistencia a los agentes antimicrobianos (Otranto *et al.*, 2009b; Ryu *et al.*, 2017).

A día de hoy está claro que existe una correlación entre los casos de thelaziosis de animales y humanos. En áreas donde la enfermedad es altamente prevalente en mascotas (perros y gatos) y carnívoros silvestres (especialmente en zorros), pueden ocurrir casos en humanos (Otranto y Dantas-Torres, 2015; Colella *et al.*, 2016a).

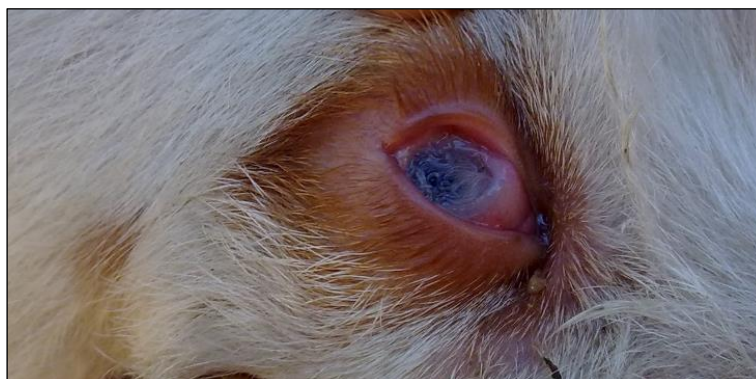
### 2.3. Patogenia

La patogénesis de *T. callipaeda* en sus hospedadores definitivos (tanto carnívoros domésticos como silvestres y lagomorfos) es bastante simple y el origen de la acción patógena se debe a la acción mecánica de las estriaciones transversales de la cutícula externa de estos nematodos sobre el epitelio conjuntival y corneal (Otranto *et al.*, 2003a; Taylor *et al.*, 2010). Al tratarse de una parasitosis tópica, no se genera una respuesta inmunitaria sistémica y solo en algunos casos, pueden producirse fenómenos alérgicos-hiperérgicos (Smeal, 1968; Fuentes *et al.*, 2012).

En consecuencia, la sintomatología depende de esta acción mecánica irritante sobre el epitelio ocular y, en caso de infección por hembras grávidas, de la presencia de un alto número de L1 (Otranto y Traversa, 2005), que generan una potente respuesta inflamatoria a nivel local debida a la presencia de estos vermes en movimiento que actúan como cuerpos extraños. Además, el efecto mecánico de la cutícula serrada sobre el epitelio conjuntival puede causar molestias y prurito con lo cual, parte de las lesiones

oculares pueden provocar autotraumatismos y, en algunos casos, el desarrollo de infecciones bacterianas secundarias.

Los adultos y fases larvarias de *Thelazia* se pueden localizar bajo los párpados, en los conductos naso-lacrimales, en el saco conjuntival y en los conductos excretores de las glándulas lacrimales, provocando cuadros de gravedad variable, desde conjuntivitis hasta uveítis en infecciones masivas (Otranto y Traversa, 2005) (**Fig. 22**).



**Figura 22.** Perro con infección masiva por *Thelazia callipaeda* asociada a alopecia periorbital y conjuntivitis.

Se ha demostrado que los adultos pueden permanecer vivos y viables durante más de un año en el saco conjuntival del hospedador definitivo (Otranto *et al.*, 2004), contribuyendo a la patogenia de esta enfermedad.

## **2.4. Cuadro clínico**

La infección por *T. callipaeda* suele comenzar de forma **subclínica** (**Fig. 23**) (Miró *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2016), especialmente cuando se trata de infecciones de un solo sexo (machos) (Otranto y Traversa, 2005).



**Figura 23.** Infección subclínica por *Thelazia callipaeda* en un perro.

La presencia de nematodos a nivel ocular puede, en ocasiones, determinar alteraciones uni o bilaterales de diversa categoría (Taylor *et al.*, 2010). Es difícil verificar la aparición de los primeros signos, aunque algunos autores (Ortiz *et al.*, 2012) consideran que acontecen entre los 7 y los 15 días desde la puesta de los vermes. En infecciones experimentales realizadas en conejos, se demostró que los parásitos adultos trasplantados en los ojos de estos animales inducían una reacción inflamatoria 3-5 horas después. Además, se describía el desarrollo de una infección purulenta caracterizada por inflamación palpebral, congestión de la conjuntiva y secreción ocular purulenta. La presencia de estos signos disminuía gradualmente una semana post-infección (revisado por Shen *et al.*, 2006).

Algunos autores han relacionado la carga parasitaria con la gravedad de los signos clínicos (Otranto y Traversa, 2005; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2010; Dacal *et al.*, 2011) mientras otros no describen esta asociación (Miró *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2012; Hodžić *et al.*, 2014).

A continuación, se recogen las manifestaciones clínicas más frecuentemente descritas en la thelaziosis canina y felina (**Tabla VIII**).

**Tabla VIII.** Signos clínicos descritos en perros y gatos con infección por *Thelazia callipaeda*.

Signos clínicos	Perro	Gato	Referencia
<b>Conjuntivitis</b>	Normalmente irritativa, de carácter mecánico, de escasa intensidad en la mayoría de los casos ( <b>Fig. 24a</b> )	De los signos más frecuentes. Normalmente irritativa, de carácter mecánico	(Hermosilla <i>et al.</i> , 2004; Malacrida <i>et al.</i> , 2008; Schottstedt, 2009; Ruytoor <i>et al.</i> , 2010; Dacal <i>et al.</i> , 2011; Miró <i>et al.</i> , 2011; Rodrigues <i>et al.</i> , 2012; Vieira <i>et al.</i> , 2012; Caron <i>et al.</i> , 2013; Gajić <i>et al.</i> , 2014; Hodžić <i>et al.</i> , 2014, 2018; Diakou <i>et al.</i> , 2015; Mihalca <i>et al.</i> , 2015; Ioniță <i>et al.</i> , 2016; Maia <i>et al.</i> , 2016; Tasić-Otašević <i>et al.</i> , 2016; Tudor <i>et al.</i> , 2016a; Papadopoulos <i>et al.</i> , 2017; Dumitrache <i>et al.</i> , 2018; Eser <i>et al.</i> , 2018; Farkas <i>et al.</i> , 2018)
<b>Epífora</b>	Moderada	Moderada	(Malacrida <i>et al.</i> , 2008; Magnis <i>et al.</i> , 2009; Pimenta <i>et al.</i> , 2013; Diakou <i>et al.</i> , 2015; Mihalca <i>et al.</i> , 2015; Colella <i>et al.</i> , 2016a; Ioniță <i>et al.</i> , 2016; Čabanová <i>et al.</i> , 2018; Dumitrache <i>et al.</i> , 2018; Silva <i>et al.</i> , 2020)
<b>Blefarospasmo</b>	Asociado a conjuntivitis o a otros problemas oculares	Asociado a conjuntivitis o a otros problemas oculares	(Rossi y Peruccio, 1989; Magnis <i>et al.</i> , 2009; Schottstedt, 2009; Pimenta <i>et al.</i> , 2013; Tudor <i>et al.</i> , 2016a)
<b>Hiperemia conjuntival</b>	Suele ser frecuente	En ocasiones, asociado a edema conjuntival	(Hodžić <i>et al.</i> , 2014, 2019; Tasić-Otašević <i>et al.</i> , 2016; Graham-Brown <i>et al.</i> , 2017; Farkas <i>et al.</i> , 2018; Silva <i>et al.</i> , 2020)
<b>Blefaritis</b>	Moderada asociada a los casos más crónicos ( <b>Fig. 24b</b> )	( <b>Fig. 25</b> )	(Ortiz <i>et al.</i> , 2012; Soares <i>et al.</i> , 2013; Papadopoulos <i>et al.</i> , 2017; Dumitrache <i>et al.</i> , 2018)
<b>Quemosis</b>	Poco frecuente	Descrito en un caso, asociado con un absceso infraorbitario	(Dorchies <i>et al.</i> , 2007; Tasić-Otašević <i>et al.</i> , 2016)
<b>Hiperplasia folicular del tercer párpado</b>	Sobre todo, en casos de conjuntivitis crónica ( <b>Fig. 24c</b> )	No se ha descrito	(Caron <i>et al.</i> , 2013; Ortiz <i>et al.</i> , 2012)
<b>Secreción ocular</b>	Primero serosa para pasar a seromucosa,	Como en el perro	(Hermosilla <i>et al.</i> , 2004; Schottstedt, 2009; Gajić <i>et al.</i> ,

	<p>pudiendo evolucionar a mucopurulenta por infección bacteriana secundaria (<i>Pasteurella</i> spp., <i>Chlamydia</i> spp. y <i>Staphylococcus</i> spp.) (Fig. 24d)</p>		<p>2014; Tudor <i>et al.</i>, 2016a; Papadopoulos <i>et al.</i>, 2017; Vieira <i>et al.</i>, 2012; Caron <i>et al.</i>, 2013; Dumitrache <i>et al.</i>, 2018; Eser <i>et al.</i>, 2018; Farkas <i>et al.</i>, 2018; Hodžić <i>et al.</i>, 2019; Jirku <i>et al.</i>, 2020; Silva <i>et al.</i>, 2020)</p>
<b>Prurito</b>	<p>No es frecuente en el curso de la thelaziosis, pero es un factor determinante en la complicación de los signos clínicos porque puede desencadenar lesiones más graves por autotraumatismo</p>	No se ha descrito	<p>(Dacal <i>et al.</i>, 2011; Vieira <i>et al.</i>, 2012)</p>
<b>Fotofobia</b>	Poco frecuente	Poco frecuente	<p>(Soares <i>et al.</i>, 2013; Dumitrache <i>et al.</i>, 2018)</p>
<b>Uveítis anterior, edema conjuntival, lagrimeo, lesiones leves y proliferativas del saco conjuntival inferior y alopecia periocular</b>	<p>Descritas de forma puntual</p>	Más común en gatos que en perros	<p>(Magnis <i>et al.</i>, 2009; Rodrigues <i>et al.</i>, 2012; Soares <i>et al.</i>, 2013; Gajić <i>et al.</i>, 2014; Diakou <i>et al.</i>, 2015; Papadopoulos <i>et al.</i>, 2017; Dumitrache <i>et al.</i>, 2018, 2019; Hodžić <i>et al.</i>, 2019)</p>
<b>Queratitis y úlceras</b>	<p>Son una complicación menos frecuente, relacionada más con autotraumatismos que se ocasionan por el intenso prurito (debido sobre todo a la presencia de infecciones bacterianas secundarias) que con la propia parasitosis</p>	<p>Se han observado casos de lesiones ulcerativas del 3<sup>er</sup> párpado (Fig. 25)</p>	<p>(Dorchies <i>et al.</i>, 2007; Malacrida <i>et al.</i>, 2008; Schottstedt, 2009; Ortiz <i>et al.</i>, 2012; Diakou <i>et al.</i>, 2015; Maia <i>et al.</i>, 2016; Graham-Brown <i>et al.</i>, 2017; Papadopoulos <i>et al.</i>, 2017)</p>
<b>Petequias</b>	<p>No son frecuentes, pero también han sido descritas</p>	No se ha descrito	<p>(Miró <i>et al.</i>, 2011)</p>
<b>Dacriociclitis</b>	<p>Ha sido documentada en un perro de raza galgo español en Bélgica</p>	No se ha descrito	<p>(Janssens y Clarebout, 2006)</p>



**Figura 24.** Signos clínicos en perros con infección por *Thelazia callipaeda*. **24a.** Conjuntivitis. Cortesía: Prof. Elisa Margarita González Alonso-Alegre. Hospital Clínico Veterinario UCM. **24b.** Quemosis. **24c.** Conjuntivitis folicular. **24d.** Blefaroconjuntivitis purulenta.

El resto del examen ocular es normal, pero debe completarse ya que existen formas atípicas (Ortiz *et al.*, 2012).

Cabe mencionar un caso de un perro con thelaziosis intraocular en cámara anterior que fue confirmado en una clínica veterinaria de Madrid; al haber sido tratado anteriormente con ivermectina y tratarse de un parásito muerto, fue necesaria la cirugía intraocular para su eliminación ante el agravamiento de la uveítis (Ortiz *et al.*, 2012). La eliminación de los parásitos intraoculares implica cirugía intraocular. No debe tratarse con antiparasitarios un paciente con un verme intraocular en cámara anterior hasta la extracción de éste, dado que la eliminación del parásito vivo es más fácil. La paracentesis de cámara anterior es suficiente para dar salida al parásito vivo siguiendo la corriente. Por el contrario, el parásito muerto requiere la manipulación quirúrgica intraocular (Ortiz *et al.*, 2012).



**Figura 25.** Blefaritis y úlcera en la conjuntiva superior en un gato con infección por *Thelazia callipaeda*. Cortesía: Inés Domínguez. Clínica Veterinaria La Plaza. El Escorial, Madrid.

Debido a la gran variedad de signos clínicos que pueden aparecer en el perro y el gato, en esta Tesis Doctoral, se ha publicado una clasificación clínica en la sección de Material y Métodos, donde se describen diferentes estadios clínicos de thelaziosis canina y felina en función de la gravedad de los signos clínicos (páginas 103, 104).

## 2.5. Diagnóstico

El diagnóstico exhaustivo debe incluir la realización de una adecuada anamnesis, seguida de la exploración ocular y la búsqueda activa de los parásitos en la cavidad ocular.

### 2.5.1. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de la infección por *T. callipaeda* consiste en la observación directa de los nematodos en el saco conjuntival, debajo del tercer párpado.

El diagnóstico puede ser difícil cuando la mayoría de los parásitos están en una etapa inmadura, cuando hay pocos nematodos adultos o en los casos en que los vermes se encuentran en los conductos excretores de las glándulas lacrimales (Caron *et al.*, 2013). La inspección ocular es esencial durante el examen clínico de rutina para detectar

correctamente las infecciones subclínicas, incluso si no hay signos oculares aparentes (Diakou, 2017).

### 2.5.1.1. Inspección ocular

El protocolo a seguir para el diagnóstico de esta parasitosis consiste en una exploración oftalmológica exhaustiva tras la instilación de un anestésico oftálmico (clorhidrato de tetracaína y clorhidrato de nafazolina, Colircusí anestésico® 0,50%), lo cual permite una evaluación completa del saco conjuntival, principal ubicación de este parásito (Bhaibulaya *et al.*, 1970; Rossi y Peruccio, 1989; Miró *et al.*, 2011; Papadopoulos *et al.*, 2017; Dumitrache *et al.*, 2018; Farkas *et al.*, 2018), siendo muy importante explorar la cara interna del 3<sup>er</sup> párpado en perros y el saco conjuntival superior en gatos, respectivamente; ya que en estas localizaciones es donde encontramos el mayor número de parásitos. La aplicación del colirio anestésico facilita la retirada del máximo número de vermes visibles ya que, permite una mejor manipulación del ojo en sedación y asegura el bienestar del paciente. Al mismo tiempo, parece tener un efecto irritante sobre los vermes lo que, en algunas ocasiones, permite verlos desplazándose por la córnea al cabo de unos segundos de su aplicación, proporcionando una mejor visibilidad de los mismos (Checa *et al.*, 2012).

Después de la eyección de la membrana nictitante, se inspecciona el fórnix conjuntival utilizando un hisopo de algodón estéril (**Fig. 24c**) o unas pinzas finas (**Fig. 24a**) que también pueden usarse para la recolección de los nematodos, cuando están presentes (Bianciardi y Otranto, 2005; Miró *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2016). Otro método puede ser el lavado con solución fisiológica estéril (*flushing*) (0,9% NaCl) (Dorchies *et al.*, 2007; Dumitrache *et al.*, 2018) realizado con una jeringuilla conectada a un catéter de goma. Una vez recolectados, los parásitos se almacenan en un tubo *ependorf* con suero salino fisiológico o alcohol 70° hasta su posterior identificación.

### 2.5.2. Diagnóstico epidemiológico

Una correcta anamnesis ante la llegada a la clínica veterinaria de un perro o un gato con signos oculares es fundamental, especialmente si su localidad de origen o historial de viajes incluye una zona de elevada prevalencia de thelaziosis en España, o

fuera de ella, en países donde esta enfermedad se haya descrito previamente (Graham-Brown *et al.*, 2017). También debemos incluir toda la información relativa a la raza, edad, sexo, peso y estado sanitario, así como las lesiones oculares. Es importante conocer si vive en el exterior (chalet, finca, etc.) o convive con otros animales, así como la presencia de ectoparásitos, enfermedades previas y si se ha empleado algún tratamiento antiparasitario como medida profiláctica.

La estacionalidad del vector de *T. callipaeda* puede ayudar a orientar un diagnóstico etiológico correcto de la enfermedad, siendo el verano y el otoño las estaciones donde se diagnostican el mayor número de casos.

### **2.5.3. Diagnóstico parasitológico**

Una vez recogidos los parásitos, en el laboratorio pueden observarse bajo un microscopio óptico o un estereomicroscopio, directamente o después del aclaramiento con lactofenol de Amman (Otranto *et al.*, 2003b). Para investigaciones biomoleculares, se conservan en etanol al 70%.

#### **2.5.3.1. Observación microscópica directa**

Los vermes se pueden identificar como ejemplares de *T. callipaeda* siguiendo las claves de identificación morfológica descritas (Skrjabin *et al.*, 1967; Bhaibulaya *et al.*, 1970; Otranto *et al.*, 2003b).

Las características morfológicas de *T. callipaeda* se han detallado en el apartado 2.1.1.3. (páginas 12-16).

Algunos autores, han realizado una diferenciación morfológica detallada de algunas especies de *Thelazia* mediante microscopía electrónica de barrido (Choi *et al.*, 1989; Naem, 2007a, 2007b, 2011). El examen de las secreciones lacrimales puede revelar la presencia de huevos o larvas de primer estadio (Naem, 2011) (**Fig. 9**), útiles también en la identificación.

### 2.5.3.2. Diagnóstico molecular

En los últimos años, se han realizado varios estudios sobre la estructura genética de las poblaciones de nematodos utilizando técnicas de biología molecular (Blouin *et al.*, 1998; Gasser y Newton, 2000; Hu *et al.*, 2004; Otranto y Traversa, 2004). El diagnóstico molecular de *Thelazia* spp. es de extraordinaria importancia a nivel de investigación y nos ha servido en el control de la infección de estos vermes oculares en los hospedadores definitivos, particularmente porque pueden darse infecciones cruzadas y las especies de hospedadores tienen diferente susceptibilidad a los antihelmínticos ensayados (Otranto y Traversa, 2005).

El diagnóstico molecular de las larvas de estos nematodos oculares en sus vectores también es muy útil para estudiar la epidemiología de la infección por *Thelazia*, su prevalencia en las moscas y el papel de las diferentes especies de insectos como hospedadores intermediarios. La aplicación de técnicas moleculares para estudiar los “vermes del ojo” supera las muchas limitaciones de la disección de los insectos: un proceso laborioso y con bajos niveles de sensibilidad (Otranto y Traversa, 2005).

Gracias a estudios previos sobre otros nematodos (Hu *et al.*, 2004), se consideró que la subunidad 1 del gen de la citocromo c oxidasa (*cox1*) mitocondrial podía ser de utilidad para investigar la caracterización molecular de diferentes poblaciones de *T. callipaeda* y así estudiar la variabilidad de las secuencias de un fragmento de 689 pb de dicha subunidad en diferentes especies (perros, gatos y zorros, en un primer momento) y de diferentes áreas geográficas en Europa (Italia, Alemania y Holanda) y en Asia (China y Corea) (Otranto *et al.*, 2005c).

Se identificaron seis regiones de nucleótidos en la *cox1* (es decir, G4A en las posiciones 89, 149, 206, 257, 539 y 608), que eran invariables entre los 37 individuos de Europa y entre los 13 individuos de Asia, pero distintos entre Europa y Asia. Estos nucleótidos pueden considerarse como buenos marcadores en el diagnóstico y caracterización de *T. callipaeda* en Europa y Asia (Otranto *et al.*, 2005c).

Para determinar el/los haplotipos de los ejemplares de *T. callipaeda* recogidos en España, se secuenciaron todos los amplicones y se determinaron las secuencias en ambas direcciones (utilizando los mismos cebadores). Las secuencias fueron alineadas mediante el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) y las alineaciones fueron comparadas con

las secuencias disponibles para la *cox1* de *T. callipaeda* en las bases de datos públicas (p. ej., NCBI en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Otranto *et al.*, 2005c).

En España, todos los vermes han sido identificados hasta la fecha como haplotipo 1 de *T. callipaeda* (GenBank nº de acceso AM042549) (Otranto *et al.*, 2005c; Miró *et al.*, 2011), siendo éste el mismo que se ha detectado en el continente europeo, tanto en animales domésticos como silvestres (zorro, lobo, gato montés, garduña, chacal y tejón) y lagomorfos (conejo y liebre) (Otranto *et al.*, 2009c; Gama *et al.*, 2016; Mihalca *et al.*, 2016), lo que demuestra su escasa variabilidad genética.

#### 2.5.4. Diagnóstico diferencial

La elevada prevalencia de la infección por *T. callipaeda* en algunos países de Europa (Italia, Francia, Alemania, Suiza, España, Portugal y, recientemente, Serbia y Rumanía) (do Vale *et al.*, 2019), unido a su gran capacidad de dispersión y potencial zoonótico, destacan la importancia de incluir esta parasitosis en el diagnóstico diferencial de los procesos que cursen con conjuntivitis, sobre todo durante la época de actividad del artrópodo vector (desde comienzos de verano hasta el otoño) (Otranto *et al.*, 2006a).

Las infecciones oculares en perros y gatos están ocasionadas por diversos agentes etiológicos, principalmente bacterias, ciertos hongos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp. y *Candida* spp.), virus (p. ej.: virus del moquillo en cachorros) o parásitos (p. ej.: *Leishmania* spp.). Cabe destacar que, como en las personas, los cánidos y los félidos pueden presentar conjuntivitis alérgicas debido a agentes ambientales (polen, determinadas plantas, etc.). También pueden cursar con conjuntivitis otro tipo de alergias, como las alimentarias (ingestión de determinados alimentos) o las alergias por contacto (por contacto con algunos productos de limpieza) (Dacal *et al.*, 2011).

Los signos clínicos y la época del año en la que se diagnostican la mayoría de las infecciones (primavera-verano), puede llevar a confundir el diagnóstico con una conjuntivitis alérgica estacional (Otranto y Dutto, 2008; Miró *et al.*, 2011; Otranto, 2011; Fuentes *et al.*, 2012; López Medrano *et al.*, 2015; Diakou, 2017) o bacteriana. Esto es particularmente importante en las primeras fases de la infección, o cuando está causada

por larvas que son pequeñas y difíciles de detectar e identificar (Otranto y Dutto, 2008), por su escaso tamaño, 3-4 mm aproximadamente.

Las parasitosis oculares son relativamente comunes en todo el mundo, los estadios adultos y/o larvarios de algunas parasitosis pueden localizarse en los tejidos oculares (glándulas lacrimales, párpados, sacos conjuntivales) o en el globo ocular (retina, cámara anterior o posterior) causando diferentes signos debidos a la localización de los parasitos o a la reacción inmune que provocan en el hospedador (Otranto y Eberhard, 2011). Cabe destacar que sólo *Thelazia* es realmente un parásito ocular; los otros causan lesiones oculares incidentalmente en el curso de migración erráticas.

Los principales nematodos que deben incluirse en el diagnóstico diferencial de la thelaziosis canina y/o felina pertenecen a los géneros *Toxocara*, *Dirofilaria*, *Onchocerca*, *Angiostrongylus* y *Gurltia*.

La toxocariosis ocular es una forma de *larva migrans* ocular que se verifica cuando las larvas del nematodo *Toxocara canis* o *T. cati* migran al ojo. Se trata de una zoonosis muy importante en medicina humana, aunque también se han descrito casos en la especie canina (Rubin y Saunders, 1965).

La dirofilariosis es una enfermedad muy común en el perro y el gato en algunas zonas de Europa (Genchi y Kramer, 2020). En la literatura, solo se han descrito algunos casos de dirofilariosis ocular en carnívoros domesticos (Hermosilla *et al.*, 2006; Otranto *et al.*, 2010; Mircean *et al.*, 2017; Agapito *et al.*, 2018), siendo esta frecuentemente descrita en medicina humana (Macarie *et al.*, 2017; Montesel *et al.*, 2019).

La oncocercosis ocular, producida por *Onchocerca lupi*, da lugar a la formación de granulomas alrededor de los nematodos adultos en la esclerótica, la conjuntiva palpebral y el tercer párpado de los perros parasitados (Hermosilla *et al.*, 2005; Tudor *et al.*, 2016b). Se han descrito casos de oncocercosis tanto en la especie canina (Hermosilla *et al.*, 2005; Miró *et al.*, 2016) como en la felina (Labelle *et al.*, 2011). Asimismo, la infección por *Onchocerca volvulus* (“ceguera de los ríos”) afecta a más de 17,7 millones de personas y provoca discapacidad visual y ceguera provocada por microfilarias que migran a los ojos tras ser liberadas por las hembras adultas en los tejidos subcutáneos del hospedador (“WHO,” s.f.).

Recientemente se han descrito varios casos de angiostrongilosis con localización ocular, incluyéndose esta parasitosis en el conjunto de las parasitosis que pueden causar enfermedad ocular (Manning, 2007; Colella *et al.*, 2016b; Cervone y Bouhanna, 2018; Ciuca *et al.*, 2019).

Por último, la infección ocular por *Gurltia paralyzans*, metastrongilido restringido a América Latina, que produce meningoencefalitis y tromboflebitis, ha sido descrito en un gato en Tenerife con uveítis unilateral y la presencia de un nematodo adulto en la cámara anterior (Udiz-Rodríguez *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que en la literatura científica hay mucha más información sobre los casos de parasitosis ocular causados por nematodos zoonóticos (p. ej. *Trichinella* spp., *Angiostrongylus cantonensis*, *Baylisascaris procyonis*, *Gnathostoma* spp., *Acanthocheilonema arbut*, entre otros) que ocurren en medicina humana (Otranto y Eberhard, 2011), siendo más limitado el conocimiento que tenemos en medicina veterinaria.

## 2.6. Control

Las estrategias propuestas para el control de esta enfermedad se centran en un diagnóstico precoz, el tratamiento de los animales infectados, la prevención de nuevos contagios y la lucha antivectorial.

El tratamiento y la prevención de la thelaziosis canina y felina causada por *T. callipaeda* es un hecho importante en los animales que viven en áreas endémicas, tales como regiones del norte y el sur de Italia (Piamonte y Basilicata) (Otranto *et al.*, 2003a), el sur de Suiza (Malacrida *et al.*, 2008), la zona noroeste de España (Cáceres y Orense) (Miró *et al.*, 2011), la zona centro-este de Portugal (Maia *et al.*, 2016), Serbia (Hadži-Milić *et al.*, 2016), las regiones del norte y centro de Grecia (Papadopoulos *et al.*, 2017) y Rumanía (Dumitrache *et al.*, 2018).

Las acciones a incluir en el control de la thelaziosis canina y felina se pueden resumir como:

- Actuaciones sobre el reservorio, mediante el uso de moléculas con eficacia terapéutica y profiláctica. Es muy importante detectar los casos en animales infectados para reducir el riesgo de infección en personas.

- Actuaciones dirigidas frente al vector adulto, evitando el contacto con el mismo para interrumpir la transmisión.

## **2.6.1. Tratamiento**

### **2.6.1.1. Extracción manual**

La eliminación mecánica de los nematodos previa sedación tópica resulta muy útil para disminuir la carga parasitaria y, en algunos casos, incluso para eliminar los vermes oculares del animal infectado. Esta técnica fue descrita por primera vez por Bhaibulaya *et al.* (1970).

La técnica para la observación y la extracción de los nematodos ha sido descrita en el apartado 2.5.1.1. de la sección anterior (página 68).

Es necesario mencionar que esta técnica puede resultar bastante invasiva y, a veces, poco efectiva, ya que no permite eliminar todos los estadios larvarios de *T. callipaeda* debido a su escaso tamaño (Lia *et al.*, 2004; Bianciardi y Otranto, 2005) y no garantiza la extracción completa de todos los nematodos presentes en el ojo, ya que pueden ocultarse debajo del tercer párpado y/o en los conductos naso-lacrimales (Caron *et al.*, 2013). En consecuencia, es necesaria siempre la aplicación posterior de un tratamiento antiparasitario tópico o sistémico.

### **2.6.1.2. Principios activos**

Cabe destacar que dentro de los productos comerciales estudiados y cuyos principios activos se enumeran a continuación y se resumen en la **Tabla IX**, los que contienen milbemicina (Milbemax<sup>®</sup>, Milpro<sup>®</sup>, Milbactor<sup>®</sup>) o moxidectina (Advocate<sup>®</sup>) son los únicos que tienen la indicación registrada en la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento de la thelaziosis canina, siendo la mayoría de

los estudios realizado en esta especie (“AEMPS, Milbemax,” 2016; “AEMPS, Milpro,” 2019; “EMA, Advocate,” 2020; “AEMPS, Milbactor,” 2020).

Recientemente, la EMA ha aceptado esta indicación a la combinación de moxidectina e imidacloprid (Advocate<sup>®</sup>) para gatos para el tratamiento de la thelaziosis en la especie felina.

**Tabla IX.** Principales principios activos empleados en el tratamiento de la thelaziosis canina y felina.

Principio activo (Fármaco)	Dosis	N.º de animales (P/G)	Eficacia	Referencia
<b>Moxidectina 1% (Cydectin®)</b>	Instilación ocular: 1-2 gotas/ ojo (6 µg)	48 P	100% a los 10 min, 24 h, 48 h, 72 h y 10 días	Lia <i>et al.</i> , 2004
<b>Moxidectina 1% (Cydectin®)</b>	Instilación ocular: 1-2 gotas/ ojo (6 µg)	16 P	78,6% a los 28 días	Montoya <i>et al.</i> , 2013b
<b>Moxidectina 1% (Cydectin®)</b>	Instilación ocular: 1-2 gotas/ ojo (6 µg)	32 P	100% a los 8 días	Rossi <i>et al.</i> , 2007
<b>Moxidectina 2,5% e Imidacloprid 10% (Advocate®) *</b>	<i>Spot-on</i> : dosis única	21 P	90,5% a los 5 días y 95,2% a los 9 días	Bianciardi y Otranto, 2005
<b>Moxidectina 2,5% e Imidacloprid 10% (Advocate®) *</b>	<i>Spot-on</i> : dosis única	16 P	100% a los 7, 14, 28 y 35 días (se aplicó una segunda dosis de tratamiento a los 28 días)	Otranto <i>et al.</i> , 2016
<b>Moxidectina 1% e Imidacloprid 10% (Advocate®) *</b>	<i>Spot-on</i> : dosis única	15 G	93,3% a los 14 días y 100% a los 28 días	Otranto <i>et al.</i> , 2019
<b>Moxidectina 10% (Guardian®)</b>	Dosis única 0,05 ml/kg (0,17 mg/kg) (s.c.)	17 P	100% a los 28 días y durante 7 meses	Montoya <i>et al.</i> , 2013b
<b>Moxidectina 10% (Guardian®)</b>	Dosis única 0,05 ml/kg (0,17 mg/kg) (s.c.)	31 P	100% a los 8 días	Rossi <i>et al.</i> , 2007
<b>Milbemicina oxima (Interceptor®)</b>	0,5-2 mg/kg (v.o.)	55 P	87,3% a la semana y 98,2% a los 14 días (después de una segunda dosis de tratamiento)	Ferroglio <i>et al.</i> , 2008
<b>Milbemicina oxima y Praziquantel (Milbemax®) *</b>	0,5 mg/kg en perros (v.o.)  2 mg/kg en gatos (v.o.)	43 P  31 G	72,7% a la semana y 90,9% a los 14 días (después de una segunda dosis de tratamiento)  53,3% a la semana y 73,3% a los 14 días (después de una segunda dosis de tratamiento)	Motta <i>et al.</i> , 2012
<b>Milbemicina oxima y Praziquantel</b>	0,5 mg/kg (v.o.)	16 P	57,4% a los 7 días, 92,8% a los 14 días (después de una segunda dosis de	Otranto <i>et al.</i> , 2016

(Milbemax®) *			tratamiento) y 100% a los 28 y 35 días	
Milbemicina oxima y Praziquantel (Milbemax®) *	2 mg/kg en gatos (v.o.)	1 G	100% a los 14 días	Montoya <i>et al.</i> , 2013a
Mebendazol (Telmin®)	20 mg/kg (v.o.) por tres días	3 P	100% (no se especifica si el día 1 o el día tres post-tratamiento)	Calero-Bernal <i>et al.</i> , 2014
Ivermectina 1%	Instilación ocular (pomada)	16 P	68,8% a los 28 días	Montoya <i>et al.</i> , 2013b
Ivermectina 1% (Ivomec®)	Dosis única 200 µl/kg (s.c.)	15 P	100% a las 4 semanas	Rossi y Peruccio, 1989
Ivermectina	0,2 mg/kg (v.o.)	57 P	100% a los 25 días	Fudge <i>et al.</i> , 2007

\*Productos registrados en la AEMPS/EMA con la indicación para el tratamiento de la thelaziosis canina y/o felina.

P: perro; G: gato; µg: microgramo; s.c.: vía subcutánea; v.o.: vía oral

#### - Moxidectina.

La moxidectina es una lactona macrocíclica de segunda generación (de la familia de las milbemicinas). Las lactonas macrocíclicas interfieren en distintos receptores (canales del cloro regulados por el GABA “ácido gamma-aminobutírico” y el glutamato) de los parásitos, alterando la transmisión y señalización de las células nerviosas (neurotransmisión) de los parásitos provocándoles una parálisis flácida, muerte y eliminación (Taylor *et al.*, 2010). Además, también impiden la reproducción de los nematodos y artrópodos parásitos (McKellar y Benchaoui, 1996). La moxidectina se utiliza para el tratamiento y la prevención de numerosas enfermedades parasitarias de los perros como la dirofilariosis y/o la ancilostomosis (Epe *et al.*, 1999; Genchi *et al.*, 2002). Es también eficaz en el tratamiento de otras parasitosis, como por ejemplo la demodicosis (Wagner y Wendlberger, 2000) y es bastante segura en los perros sensibles a las avermectinas (Paul *et al.*, 2000). Finalmente, la moxidectina ha demostrado su eficacia frente a las infestaciones por garrapatas en el ganado en numerosos estudios, pero en la bibliografía hay poca información sobre su capacidad para eliminar las garrapatas que parasitan comúnmente a perros y gatos en las concentraciones aprobadas (Davey *et al.*, 2005; Nolan y Lok, 2012).

En un estudio llevado a cabo por Biancicardi y Otranto (2005) se probó la eficacia terapéutica de la moxidectina frente a la infección por *T. callipaeda*; para ello, utilizaron una combinación de imidacloprid (10mg/kg) con moxidectina (2,5mg/kg) en *spot-on* (Advocate<sup>®</sup>, Bayer HealthCare). Este estudio se desarrolló en la región de Basilicata (sur de Italia) en un periodo en el que los perros estaban infectados por *T. callipaeda*, pero en ausencia del vector debido a las condiciones climáticas (entre diciembre y marzo). Observaron una eficacia adulticida y larvicida del 95,2% nueve días después del tratamiento.

En otro estudio, llevado a cabo también en el sur de Italia, este tratamiento fue 100% eficaz 7, 14, 28 y 35 días después de su administración (Otranto *et al.*, 2016).

El imidacloprid es un insecticida altamente eficaz frente a la infestación por pulgas durante un período de cuatro semanas (Dryden *et al.*, 2000). El imidacloprid interfiere con ciertos receptores específicos (receptores de acetilcolina nicotinérgicos) en el sistema nervioso de piojos y pulgas, lo que resulta en su posterior parálisis y muerte. La ventaja de esta formulación tópica (imidacloprid y moxidectina) es el amplio espectro de acción tanto frente a nematodos como a ectoparásitos.

En los gatos, recientemente se ha demostrado que una combinación de imidacloprid al 10% y moxidectina al 1% es altamente eficaz (93,3% a los catorce días del tratamiento y 100% a los 28) en el tratamiento de la thelaziosis felina (Otranto *et al.*, 2019).

También ha demostrado una buena eficacia terapéutica, una solución inyectable de moxidectina al 1% (Cydectin<sup>®</sup> Virbac Animal Health) administrada mediante instilación ocular en perros con infección natural por *T. callipaeda* (Lia *et al.*, 2004; Montoya *et al.*, 2013b). Aplicando dos gotas en cada ojo, lo que se corresponde aproximadamente con 6µg de moxidectina, se consiguió una actividad antihelmíntica curativa del 100% después de 10 min, 24 h, 48 h, 72 h y 10 días, aunque esta capacidad no persistió en el tiempo (Lia *et al.*, 2004). En otro ensayo realizado posteriormente por nuestro grupo de investigación, la aplicación de un colirio a base de moxidectina al 1% resultó tener una eficacia del 78,6% 28 días después del tratamiento (Montoya *et al.*, 2013b).

Por último, una única dosis subcutánea de moxidectina al 10% (Guardian<sup>®</sup>, Elanco Animal Health), recomendada para la prevención de *Dirofilaria immitis*, demostró ser 100% eficaz después de 8 días y durante los siguientes seis meses (de junio a enero) (Rossi *et al.*, 2007). Este efecto se investigó también en 17 perros en España procedentes de La Vera (Cáceres) que resultaron negativos a los 28 días del mismo tratamiento (Montoya *et al.*, 2013b).

#### - **Milbemicina oxima**

La milbemicina oxima, como otras lactonas macrocíclicas del grupo de las milbemicinas (similar mecanismo de acción de la moxidectina), es un antihelmíntico nematocida y acaricida de amplio espectro (McKellar y Benchaoui, 1996).

Se ha observado que la administración oral de milbemicina oxima, a una dosis mínima de 0,5 mg/kg, (Interceptor<sup>®</sup>, Elanco Animal Health) da lugar a un porcentaje de reducción en el número de vermes adultos de *T. callipaeda* del 87,3%, una semana después del tratamiento. A los perros que permanecieron positivos después del primer tratamiento se les administró una segunda dosis y fueron revisados una semana más tarde obteniendo entonces una tasa de reducción de la infección del 98,2 % (Ferroglio *et al.*, 2008). Los mismos autores sugieren que una dosis inferior a 0,68 mg/kg de milbemicina oxima no es apropiada para el tratamiento de la infección por *T. callipaeda*; mientras que una dosis de 0,70 mg/kg demuestra una eficacia del 95,8% y una dosis de 0,86 mg/kg del 100% (Ferroglio *et al.*, 2008).

También se ha demostrado una eficacia terapéutica elevada de la formulación oral de la combinación de milbemicina oxima con praziquantel (Milbemax<sup>®</sup>, Elanco Animal Health) frente a la thelaziosis canina y felina (Motta *et al.*, 2012; Montoya *et al.*, 2013b; Otranto *et al.*, 2016). La dosis mínima de milbemicina oxima recomendada es de 0,5 mg/kg y 2 mg/kg para perros y gatos, respectivamente. En un estudio llevado a cabo en áreas endémicas en Suiza y en Italia, los porcentajes de reducción fueron significativamente mayores en el grupo tratado con Milbemax<sup>®</sup> que en el grupo control; tanto en gatos como en perros. En perros, la eficacia fue del 72,7% y 90,9% los días 7 y 14 post-tratamiento. En gatos, la eficacia terapéutica los días 7 y 14 post-tratamiento fue del 53,3% y 73,3%, respectivamente. Todos los animales positivos el día 7 post-tratamiento recibieron una segunda dosis de tratamiento (Motta *et al.*, 2012). En una

investigación adicional, la eficacia de este tratamiento fue de 57,4%, 92,8% y 100% los días 7, 14 y 28 post-tratamiento (Otranto *et al.*, 2016).

En varios estudios, se ha observado una mayor eficacia de la milbemicina oxima (a una dosis mínima de 0,5 mg/kg, vía oral) después del segundo tratamiento (con un intervalo de una semana). Esto puede explicarse porque es necesario alcanzar una óptima concentración en sangre de este principio activo para alcanzar una dosis terapéutica en la conjuntiva (Ferroglia *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2012).

Otro ejemplo de la eficacia de esta molécula para el tratamiento de la thelaziosis felina es un caso que fue tratado en la consulta de enfermedades infecciosas y parasitarias de la Facultad de Veterinaria de la UCM (Universidad Complutense de Madrid), demostrando la eficacia del producto a la semana del tratamiento (Montoya *et al.*, 2013a).

Es conocido que los dos principios activos mencionados (milbemicina oxima y praziquantel) no presentan interferencias entre ellos, y que el praziquantel no es eficaz frente a nematodos. Por tanto, otras formulaciones que contengan milbemicina oxima sola o en combinación con otros principios activos pueden ser igualmente eficaces en el tratamiento de la infección por *T. callipaeda*. La ventaja de este tratamiento es el amplio espectro de acción de la combinación del praziquantel y la milbemicina oxima frente a cestodos y nematodos del gato y del perro (Motta *et al.*, 2012).

#### - **Ivermectina**

La ivermectina, al igual que los principios activos descritos anteriormente, es otra lactona macrocíclica, pero en este caso, pertenece al grupo de las avermectinas. Posee el mismo mecanismo de acción y también tiene un amplio espectro de acción frente a una gran variedad de artrópodos y nematodos.

La administración subcutánea de 200 µg/kg al 1% de ivermectina (Ivomec<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim Animal Health) demostró ser eficaz en el tratamiento de la thelaziosis canina en 15 perros procedentes del norte de Italia (Rossi y Peruccio, 1989).

La formulación oral de esta molécula se estudió en un ensayo clínico en perros de raza Pastor Alemán. En este estudio, la ivermectina administrada por vía oral a una dosis

de 0,2 mg/kg cada 3 semanas redujo significativamente la prevalencia de estos vermes oculares en los perros tratados (Fudge *et al.*, 2007).

Por último, se analizó la eficacia de una formulación de ivermectina al 1% en pomada ocular en 16 perros con infección natural por *T. callipaeda* procedentes de La Vera (Cáceres). La eficacia terapéutica resultó ser del 68,8% a los 28 días (Montoya *et al.*, 2013b).

- **Mebendazol y organofosforados.**

El mebendazol es un antihelmíntico del grupo de los benzimidazol-carbamatos que interfiere en el metabolismo energético del parásito inhibiendo el transporte de glucosa. Induce la desaparición de los microtúbulos citoplasmáticos en los nematodos originando un bloqueo en el transporte de gránulos de secreción lo que provoca el cese en la movilización de sustancias subcelulares como la glucosa (Taylor *et al.*, 2010).

Este medicamento oral, a una dosis de 20 mg/kg (Telmin<sup>®</sup>, Ecuphar Animal Healthcare), se utilizó en el tratamiento de la infección por *T. callipaeda* en tres perros de raza Border Collie (una raza canina sensible a las lactonas macrocíclicas debido a la posible mutación del gen MDR-1), demostrando su eficacia y seguridad (Calero-Bernal *et al.*, 2014).

Los compuestos organofosforados, provocan una inhibición de la acetilcolinesterasa provocando la interrupción de la transmisión neuromuscular y la parálisis subsiguiente de los nematodos parásitos (Adams, 2001).

Michalski (1976) descubrió que 2 ml de levamisol inoculado en el saco subconjuntival fue más eficaz que el levamisol administrado por vía oral. Según lo descrito por Rossi y Peruccio (1989), el tratamiento etiológico de la thelaziosis ocular canina, hasta entonces, consistía en la extracción de los vermes oculares y la aplicación de productos organofosforados, como el isofluorofato o el yoduro de ecotiofato.

Cabe señalar que estos principios activos no se utilizan a día de hoy en el tratamiento de la thelaziosis.

### 2.6.1.3. Tipos de presentación

En los últimos años, debido a la importancia que ha adquirido esta infección, se ha estudiado la eficacia terapéutica y profiláctica de diferentes principios activos. En base a ello, el tratamiento de la thelaziosis se basa en la retirada previa del máximo número de vermes posibles, tal y como se ha descrito en el apartado 2.5.1.1. de la sección sobre el diagnóstico (página 68), y la posterior aplicación de un antiparasitario con actividad nematocida mediante aplicación ocular tópica (Lia *et al.*, 2004; Montoya *et al.*, 2013b), *spot-on* (Bianciardi y Otranto, 2005; Otranto *et al.*, 2016), oral (Fudge *et al.*, 2007; Ferroglio *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2012; Calero-Bernal *et al.*, 2014) o inyectable (Rossi y Peruccio, 1989; Rossi *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2013b):

#### - Formulaciones *spot-on*:

Aplicados mediante pipetas con lo que el insecticida se distribuye uniformemente por el estrato córneo del animal tratado. Estas formulaciones son sencillas de administrar y facilitan la aplicación del medicamento en perros de difícil manejo, permitiendo su aplicación cuando están distraídos (p. ej. mientras comen) (Bianciardi y Otranto, 2005). Esta observación puede ser de gran utilidad en perros que viven el campo y/o pastorean los rebaños ya que presentan un elevado riesgo de infección por *T. callipaeda* en zonas endémicas (Otranto *et al.*, 2003a). Por el contrario, puede reducir su eficacia si los perros/gatos se mojan (p. ej. días lluviosos, charcos, etc.) en las primeras 24-48 horas tras la aplicación. Esta vía de administración es muy segura y no presenta ningún efecto secundario asociado a daño tisular (Bianciardi y Otranto, 2005).

Se ha empleado la siguiente combinación (**Tablas IX y X**):

- Imidacloprid 10% y moxidectina 2.5%

#### - Formulaciones tópicas:

Se aplican directamente a nivel ocular a través de pomadas o colirios. La administración de un medicamento local en lugar de sistémica es más directa y requiere una cantidad menor del producto (Lia *et al.*, 2004). La vía ocular permite reducir la dosis y pasar por ejemplo de 200 µg/kg de ivermectina a 6 µg en total de moxidectina, lo que implica reducir los efectos secundarios (Lia *et al.*, 2004). Por otra parte, requiere un

control de los animales y a veces puede causar lesiones debido a los movimientos bruscos del perro durante su manipulación (Bianciardi y Otranto, 2005).

Se han empleado diferentes principios activos (**Tablas IX y X**):

- Moxidectina 1%
- Ivermectina 1%

**- Formulaciones orales:**

Se presentan en comprimidos orales palatables, lo que facilita su administración. *T. callipaeda* se localiza en los conductos nasolacrimales del hospedador definitivo, con lo cual es necesario asegurar concentraciones sanguíneas óptimas del principio activo para alcanzar la eficacia terapéutica deseada. Por esta razón, se ha comprobado una mayor eficacia del producto después del segundo tratamiento, a la semana de administrar el primero (Ferroglia *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2012).

Además, la administración de tratamientos orales evita el problema de la reducción de la eficacia que se verifica con las formulaciones *spot-on* cuando el animal se baña después de la aplicación del tratamiento, o la disminución de la eficacia en días lluviosos.

Se han empleado diferentes principios activos y combinaciones (**Tablas IX y X**):

- Ivermectina 0,2 mg/kg p.v.
- Milbemicina oxima 0,5 mg/kg p.v.
- Milbemicina oxima 0,5 mg/kg p.v. y praziquantel 5 mg/kg p.v.
- Mebendazol 20 mg/kg p.v.
- Afoxolaner 2,50–5,36 mg/kg p.v. y milbemicina oxima 0,50-1,07 mg/kg p.v.

**- Formulaciones sistémicas:**

Se han empleado los siguientes principios activos aplicados por vía subcutánea en el tratamiento de la thelaziosis canina y felina (**Tablas IX y X**):

- Ivermectina 1%
- Moxidectina 10%

Según el principio activo, se han obtenido resultados diferentes con este tipo de formulación. El uso de ivermectina en inyecciones subcutáneas ha demostrado ser

doloroso y puede causar daño tisular debido a la presencia de propilenglicol en su formulación (Lia *et al.*, 2004). Por otro lado, el uso de una formulación inyectable de liberación sostenida de moxidectina no ha demostrado tener efectos secundarios en los estudios realizados y permite obtener una protección más duradera en el tiempo (Rossi *et al.*, 2007).

#### **2.6.1.4. Tratamientos complementarios**

La thelaziosis canina causada por *T. callipaeda* frecuentemente acaba produciendo conjuntivitis y secreción ocular (descarga mucopurulenta). Los signos clínicos, generalmente, se resuelven rápidamente después de la eliminación de los vermes. No obstante, en el caso de infecciones masivas, se suele producir una colonización bacteriana secundaria que da lugar a una conjuntivitis purulenta y puede ser necesario la utilización de antibioterapia tópica. El tratamiento mediante una combinación de antibiótico/antiinflamatorio, puede estar indicado tras la eliminación manual de los parásitos, según la gravedad de los signos clínicos (Ortiz *et al.*, 2012).

#### **2.6.2. Profilaxis**

La profilaxis se basa esencialmente en reducir la transmisión de la infección por *T. callipaeda* y en la lucha frente a los vectores artrópodos.

El enfoque quimioprofiláctico, al tratarse de una zoonosis, debe ir encaminado a reducir la prevalencia y, en consecuencia, el riesgo de la infección de personas en zonas endémicas.

Los tratamientos antihelmínticos mensuales ya han sido recomendados como estrategia de control para la dirofilariosis y otras infecciones por helmintos (ESCCAP, 2012) y pueden ser muy útiles para animales que viven en áreas endémicas de *T. callipaeda* (Motta *et al.*, 2012), siendo este un parásito sensible a otros nematocidas de uso veterinario. Se debe intentar la eliminación de las fases larvarias de este parásito poco después de su transmisión a través del vector, para poder interrumpir de esta manera el ciclo de transmisión (Otranto *et al.*, 2004).

Se aconseja realizar el tratamiento de todos los animales domésticos infectados, y realizar un protocolo de prevención tanto de los perros y gatos que viven en zonas endémicas como de los que viajen a las mismas en la época de actividad del vector. Es fundamental el control de los viajes con mascotas ya que pueden determinar la presencia de nuevos focos en países, como Reino Unido, donde se ha descrito la presencia del vector (Palfreyman *et al.*, 2018) pero aún no se han descrito casos autóctonos de la infección, aunque sí se han registrado casos importados en animales procedentes de otros países (Graham-Brown *et al.*, 2016, 2017; Hammond, 2018). Por otro lado, son muchas las mascotas que viajan junto con sus propietarios desde zonas no endémicas a zonas endémicas. Estos animales deberían ser tratados previamente ya que, existe el riesgo de que adquieran la infección si el viaje se produce durante los meses de actividad del vector; como ya se ha descrito en perros de Europa central, que se infectaron porque habían estado en época estival en Italia (Chermette *et al.*, 2004; Hermosilla *et al.*, 2004).

#### **2.6.2.1. Principios activos**

Entre los principios activos estudiados y que se citan a continuación en la **Tabla X**, la única molécula registrada actualmente en Europa para la prevención de la thelaziosis canina (“EMA, Nexgard Spectra,” 2020) es un producto comercial que contiene milbemicina (Nexgard Spectra<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim Animal Health).

A día de hoy ningún principio activo presenta indicación para la prevención de la infección en gatos en el registro de la EMA, porque no se han realizado estudios de eficacia profiláctica en esta especie.

**Tabla X.** Principios activos empleados en la prevención de la thelaziosis canina.

Principio activo (Fármaco)	Dosis	N.º de perros	Eficacia	Referencia
<b>Moxidectina 1% (Cydectin®)</b>	Instilación ocular: 1-2 gotas/ojo (6 µg) Mensual	16	30-87,5% durante el año	Montoya <i>et al.</i> , 2013b
<b>Moxidectina 1% (Cydectin®)</b>	Instilación ocular: 1-2 gotas/ojo (6 µg) Única dosis	32	65,63% a los 223 días (7 meses)	Rossi <i>et al.</i> , 2007
<b>Moxidectina 10% (Guardian®)</b>	Dosis única 0,05 ml/kg (0,17 mg/kg) (s.c.) Única dosis	17	100% durante 7 meses; 0% al año	Montoya <i>et al.</i> , 2013b
<b>Moxidectina 10% (Guardian®)</b>	Dosis única 0,05 ml/kg (0,17 mg/kg) (s.c.) Única dosis	31	100% a los 223 días (7 meses)	Rossi <i>et al.</i> , 2007
<b>Moxidectina 2,5% e imidacloprid 10%</b>	<i>Spot-on</i> : mensual	33	100% durante 8 meses	(Lechat <i>et al.</i> , 2015)
<b>Milbemicina oxima (Interceptor®)</b>	0,5-2 mg/kg (v.o.) Mensual	30	90% durante 5 meses	Ferroglio <i>et al.</i> , 2008
<b>Milbemicina oxima y afoxolaner (Nexgard Spectra®) *</b>	0,5 mg/kg milbemicina oxima y 2,5 mg/kg afoxolaner (v.o.) Mensual	37	100% durante 6 meses	(Lebon <i>et al.</i> , 2019)
<b>Ivermectina 1%</b>	Instilación ocular (pomada) Mensual	16	75-100% al año	Montoya <i>et al.</i> , 2013b
<b>Ivermectina</b>	0,2 mg/kg (v.o.) Cada 3 semanas	57	95% a los 50 días	Fudge <i>et al.</i> , 2007
<b>Flumetrina 4,5% e imidacloprid 10% (Seresto®)</b>	Collar Anual	36	No se demostró eficacia	(Lechat <i>et al.</i> , 2015)

\*Productos registrados en la AEMPS/EMA con la indicación para la prevención de la thelaziosis canina.

µg: microgramo; s.c.: vía subcutánea; v.o.: vía oral

- **Moxidectina**

La administración de una formulación inyectable de liberación prolongada de moxidectina (Guardian® Elanco Animal Health) a una dosis de 0,17 mg/kg tiene acción terapéutica frente a la infección de *T. callipaeda* y además proporciona una protección durante 7 meses (desde junio hasta enero) en perros que viven en zonas endémicas de thelaziosis canina (Rossi *et al.*, 2007). Esta formulación es conocida por ser utilizada como herramienta profiláctica frente a la infección por *Dirofilaria immitis* (Genchi *et al.*, 2002).

Otro estudio llevado a cabo por nuestro equipo de investigación demostró resultados similares sobre la eficacia profiláctica de una formulación inyectable de moxidectina al 10% a una dosis de 0,05 mg/Kg (Montoya *et al.*, 2013b).

En el mismo estudio se analizó la acción profiláctica de una formulación tópica de moxidectina al 1% en instilación ocular. Solo el 7,1% de los perros tratados mensualmente con este tratamiento resultaron negativos al finalizar el año de estudio.

Por último, la aplicación mensual de una formulación *spot-on* a base de imidacloprid y moxidectina tuvo una eficacia del 100% para la prevención de la infección por *T. callipaeda* en una población de perros que vivían en una zona endémica de Francia durante la época de actividad del vector (mayo - enero) (Lechat *et al.*, 2015).

- **Milbemicina oxima**

Los productos a base de milbemicina oxima estudiados en la prevención de la infección por *T. callipaeda* están disponibles en el mercado en formulación oral.

Se han realizado dos ensayos para evaluar las propiedades profilácticas de esta molécula. En un primer ensayo, se registró una eficacia profiláctica del 90% en la reducción del grado de infección por *T. callipaeda* aplicando el medicamento de forma mensual a una dosis igual o superior a 0,5 mg/kg (dosis recomendada para la profilaxis de la infección por *D. immitis*) (Ferroglio *et al.*, 2008). El segundo estudio se realizó en áreas endémicas de Francia y España donde se trataron 37 perros que fueron evaluados mensualmente durante un período de 6 meses buscando la presencia de estos nematodos y ninguno de ellos resultó positivo a finales del estudio, demostrando una eficacia del 100% (Lebon *et al.*, 2019).

- **Ivermectina**

La ivermectina administrada por vía oral a la dosis de 0,2 mg/kg cada 3 semanas redujo la prevalencia de la infección en perros, aunque no evitó que los perros se reinfectaran (Fudge *et al.*, 2007).

En otro estudio, se analizó la eficacia terapéutica y profiláctica de una formulación de ivermectina al 1% en pomada ocular en 16 perros tratados mensualmente. En este caso la eficacia profiláctica de la ivermectina fue del 56,6% al finalizar el año de estudio (Montoya *et al.*, 2013b).

### **2.6.2.2. Lucha antivectorial**

Al tratarse de una enfermedad transmitida por un vector artrópodo, se debe prevenir el contacto de los animales con el hospedador invertebrado (*P. variegata*). El método más eficaz de prevenir la transmisión es garantizar que las mascotas no transiten por áreas con alta densidad de drosófilas y se mantengan en interiores cuando la actividad de estos hospedadores invertebrados es más alta, utilizando mosquiteras en los lugares donde se alojan los animales y evitando poner sus casetas debajo de los árboles (robles, frutales, etc.) (Otranto *et al.*, 2004).

Se ha postulado que el uso de insecticidas podría limitar la exposición de los perros al vector *P. variegata* y evitar así la infección. La flumetrina es un piretroide sintético que tiene un efecto repelente e insecticida con capacidad de persistir en el manto cutáneo. Actúa ejerciendo una acción neurotóxica sobre los nervios sensitivos y motores del sistema nervioso de los artrópodos (Taylor *et al.*, 2010). Los collares impregnados con este compuesto han proporcionado resultados prometedores y una protección duradera de los perros frente a las principales enfermedades transmitidas por vectores (Dantas-Torres *et al.*, 2013). Por esta razón, se investigó si la aplicación de un collar insecticida de liberación lenta a base de un 10% de imidacloprid y 4,5% de flumetrina (Seresto<sup>®</sup>, Bayer HealthCareAnimal) podría reducir la transmisión de *T. callipaeda* en perros que vivían en una zona endémica de Francia (Lechat *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos demostraron que este collar no mostró ninguna protección frente a la infección.

La cantidad del principio activo liberado por el collar que llega al saco conjuntival, donde estas moscas suelen alimentarse, y el poco tiempo de contacto probablemente no

sean suficiente para garantizar una actividad repelente antes de que puedan alimentarse y transmitir las larvas de *T. callipaeda* (Lechat *et al.*, 2015).

La permetrina y la deltametrina son insecticidas con suficiente actividad repelente y rapidez de acción para hacerlos adecuados en el control de las picaduras de flebotomos en perros (Otranto y Wall, 2008), pero a día de hoy no hay información disponible sobre la utilidad de estos principios activos como repelentes frente a *P. variegata*. Es necesario, por tanto, el desarrollo de estudios de eficacia repelente e insecticida frente a las drosófilas con aplicación en el perro y el gato.

En zonas donde haya alta densidad de moscas, el ambiente doméstico debe protegerse con mallas en ventanas y puertas (Otranto y Wall, 2008). En medicina humana de hecho, se recomienda el uso de mosquiteras para evitar el contacto con el vector de *T. callipaeda* (Shen *et al.*, 2006).



### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En estos últimos 10 años la comunidad científica internacional ha publicado numerosos trabajos que han supuesto un gran avance en el conocimiento de la infección por *Thelazia callipaeda* en Europa. Sin embargo, aún se necesita ahondar más en aspectos relacionados con el hospedador, el vector y el hábitat. Asimismo, es necesario consensuar pautas para el abordaje clínico de los casos de thelaziosis en el perro y el gato.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es profundizar en el conocimiento sobre la infección por *Thelazia callipaeda* en las especies canina y felina en España y los factores asociados a la presencia de su vector *Phortica variegata*.

Para ello, hemos abordado los siguientes objetivos específicos:

**a. Relacionados con el vector:**

- i. Estudiar el papel vectorial de *Phortica variegata* en España.**
- ii. Determinar la presencia y abundancia de *Phortica variegata* en los focos autóctonos detectados de infección por *Thelazia callipaeda*.**
- iii. Determinar las variables ambientales que influyen sobre la abundancia de *Phortica variegata* y su dinámica estacional.**

**b. Relacionados con el hospedador:**

- i. Determinar la prevalencia actual de la thelaziosis canina y felina en áreas endémicas de España.**
- ii. Determinar los factores de riesgo que influyen sobre la infección por *Thelazia callipaeda* en el perro y el gato.**
- iii. Diseñar una clasificación clínica de los pacientes con thelaziosis canina y felina.**
- iv. Desarrollar mapas actualizados de la distribución geográfica de los casos de thelaziosis canina y felina en España, desde su primera denuncia hasta la actualidad.**
- v. Evaluar y comparar la eficacia terapéutica y profiláctica de diferentes formulaciones utilizadas en perros y en gatos frente a la infección por *Thelazia callipaeda*.**



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Debido a la presentación de la presente Tesis Doctoral en formato de publicaciones, en esta sección se presenta el plan de trabajo sistemático común a todos los estudios de investigación que la componen. La metodología particular de cada uno de los estudios se puede consultar en la sección de “Material y Métodos” de cada una de las publicaciones científicas incluidas en la sección de “Resultados”.

### 4.1. Área de estudio

La primera parte del estudio epidemiológico sobre la distribución geográfica de casos de thelaziosis se ha llevado a cabo mediante la creación de una red de clínicas veterinarias en diferentes partes de España. Se hizo una petición por correo electrónico y/o por teléfono a los veterinarios responsables de las mismas para recabar información sobre todos los casos registrados en sus clínicas. En total se recogieron datos de 73 clínicas veterinarias en España y una en Andorra que participaron en el estudio sobre la thelaziosis canina completando un formulario (Anexo I), en el que se notificó cualquier caso de infección detectado desde mayo de 2010 hasta diciembre de 2018. En el estudio sobre la thelaziosis felina, se recogieron datos de 23 clínicas veterinarias de España desde octubre de 2010 hasta marzo de 2020.

La segunda parte del estudio para determinar la prevalencia de la infección por *T. callipaeda* consistió en la búsqueda activa de casos en perros y gatos de varias localidades donde habían sido descritos previamente casos autóctonos de thelaziosis. Algunos de los animales incluidos en este estudio de prevalencia, se incluyeron también en el de tratamiento y profilaxis de la thelaziosis canina y felina. Los propietarios tuvieron que firmar un consentimiento informado para la inclusión de sus mascotas en cada uno de los grupos (Anexos II, III, IV y V).

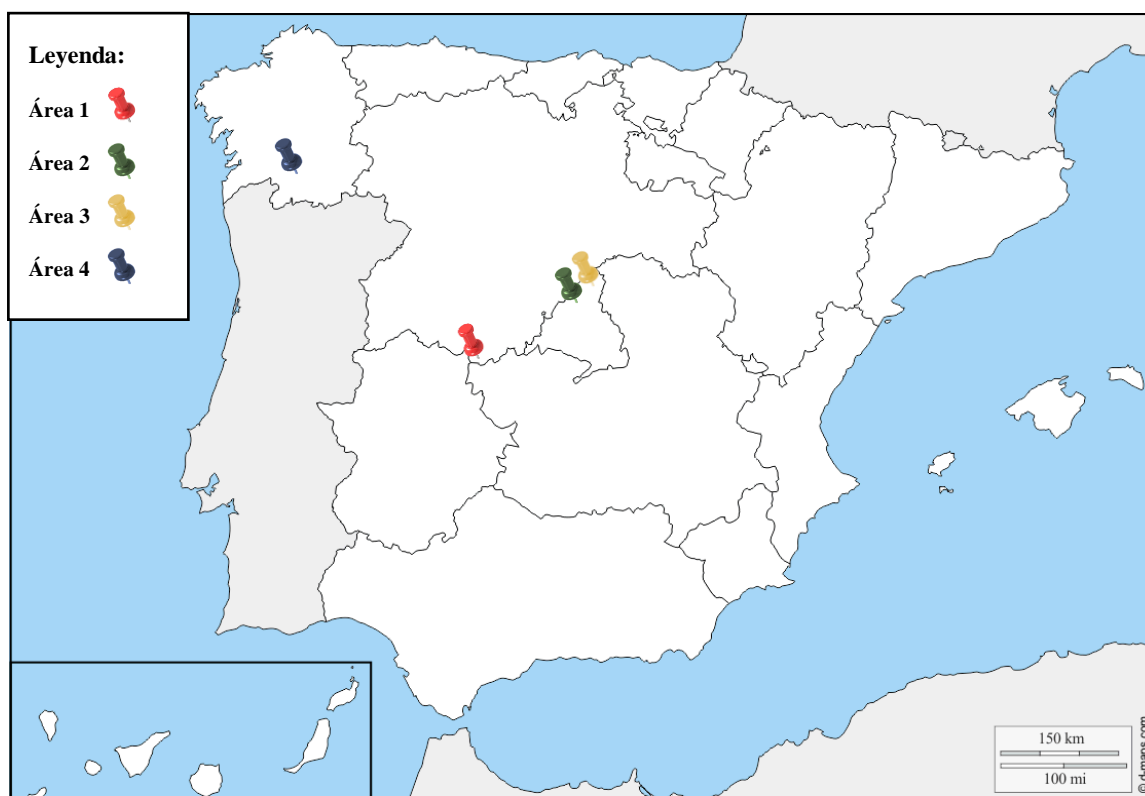
Los muestreos de prevalencia, tratamiento y profilaxis se llevaron a cabo en varias localidades de la Península Ibérica:

- 1) Municipios de Madrigal de la Vera (Cáceres) y Candeleda (Ávila): centro-oeste de España (40°9'41"N, 5°23'13"O). Esta área geográfica se caracteriza por la presencia de montañas con valles, ríos y vegetación representada principalmente por robles, castaños y cerezos (**Fig. 26**). Los cultivos típicos incluyen pimientos, tabaco, frambuesas y kiwis. La altitud varía entre 250 y 2000 m sobre el nivel del mar (m s.n.m.) con una altitud promedio de 360 a 800 m s.n.m. (Rivas-Martínez *et al.*, 1987; Rivas-Martínez y Arregui, 1999). La temperatura media registrada de mayo a octubre oscila entre 17 y 30°C, con una humedad relativa elevada (75-90%) y un promedio anual de lluvia registrada de 56,9 mm (2- 162,4 mm) (Agencia Estatal de Meteorología [AEMET], s.f.). Son característicos de la zona mamíferos tales como ciervo (*Cervus elaphus*), jabalí (*Sus scrofa*), corzo (*Capreolus capreolus*), gamo (*Dama dama*), tejón (*Meles meles*), gato salvaje (*Felis silvestris*), zorro rojo (*Vulpes vulpes*), lobo gris (*Canis lupus*) y liebre (*Lepus europaeus*) (Rivas-Martínez *et al.*, 1987; Rivas-Martínez y Arregui, 1999).



**Figura 26.** Zona 1 de muestreo en la localidad de Madrigal de la Vera (Cáceres), caracterizada por la presencia de robles.

- 2) Municipios de Galapagar, Villalba y El Escorial, incluyéndose en este último las pedanías de Navalquejigo y Peralejo (noroeste de la provincia de Madrid). Estos municipios se encuentran en la Sierra de Guadarrama (41°4'N, 3°44'O a 40°22'N, 4°18'O), alineación montañosa que limita al noroeste con las provincias de Ávila y Segovia, y al sureste con la provincia de Madrid. Esta región de montaña tiene una altitud comprendida entre los 900 y los 2.428 m s.n.m., y en ella nacen numerosos arroyos y ríos (“Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama,” s.f.). Tratándose de un sistema montañoso, existe un gradiente climático, de manera que, al aumentar la altitud, las precipitaciones son más abundantes y la temperatura más baja. Se trata de un clima mediterráneo, con una temperatura media de -0,7°C (enero) y de 16,4°C (julio). Los valores de humedad relativa también son muy variables en función de la época del año, siendo la media en el mes de enero del 82% y en julio del 54%. La precipitación media anual es de 1.325 mm (“AEMET,” s.f.). La vegetación de esta sierra se caracteriza por la presencia de abundantes pinos, robles y encinares en las zonas más bajas, así como pastizales y arbustos en la zona de alta montaña. En este ecosistema habitan diferentes mamíferos: ciervos, jabalíes, corzos, gamos, tejones, mustélidos, gatos monteses, zorros, lobos y liebres (“Sistema de observación meteorológica,” s.f.).
  
- 3) Municipio de Miraflores de la Sierra (norte de la provincia de Madrid) que también pertenece a la Sierra de Guadarrama; altitud 1147 m s.n.m.; con características climáticas y ambientales afines a las anteriores.
  
- 4) Orense (42°22'37"N, 8°02'05"O) en el Noroeste de España; altitud 914 m s.n.m. Dada su localización, se define como una región mediterránea ibero-atlántica y específicamente pertenece al sector Orensano-Sanabriense, caracterizado por la presencia de bosques de robles *Quercus rotundifolia* y *Q. pyrenaica* (Rivas-Martínez *et al.*, 1987; Rivas-Martínez y Arregui, 1999). La temperatura media registrada de mayo a octubre oscila entre 16 y 27°C, y el promedio anual de precipitaciones es de 811 mm (“AEMET,” s.f.).



**Figura 27.** Localización de los cuatro puntos de muestreo: (1) región de la Vera, (2) El Escorial, (3) Miraflores de la Sierra, (4) Orense.

## 4.2. Examen clínico de los animales incluidos en los diferentes estudios

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, de todos los animales incluidos en los muestreos se rellenó una ficha clínica (Anexo I) donde se recogía la siguiente información: nombre del animal, datos del propietario, localidad, tipo de vivienda, raza, edad, sexo, peso, contacto con otros animales, historial de viajes, estado sanitario, presencia de vermes oculares, número y localización de los mismos, lesiones oculares, protocolo de desparasitación y otras observaciones de interés.

Además de cumplimentarse la ficha clínica, a todos los animales se les realizó una exploración oftalmológica exhaustiva con la ayuda de un hisopo de algodón estéril (**Fig. 28a**) o mediante un lavado con solución salina fisiológica. Previamente se les administraron una o dos gotas en cada ojo de colirio anestésico (clorhidrato de tetracaína y clorhidrato de nafazolina, Colircusí anestésico doble® 0,05%) para facilitar la exploración del saco conjuntival donde se localizan un mayor número de nematodos (Hernández L. *et al.*, 2012b).

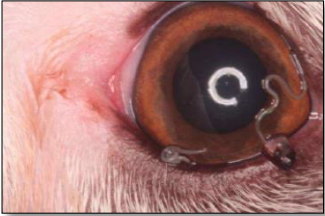





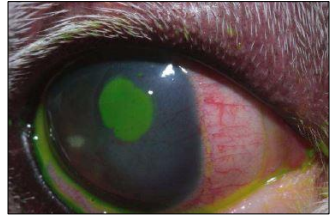



**Figura 28.** Recogida y almacenamiento de los especímenes de *Thelazia callipaeda*. **28a.** Exploración oftalmológica con la ayuda de un hisopo de algodón estéril. **28b.** Ejemplares de *Thelazia* spp. en un tubo *ependorf*.




Todos los animales fueron evaluados aplicando un sistema de clasificación clínica diseñado con la ayuda de un veterinario oftalmólogo (Dr. Mauro Hernández). En los perros en los que se detectó *T. callipaeda*, se definieron los siguientes estadios clínicos: Estadio 1 (ausencia de signos clínicos), Estadio 2 (desde una conjuntivitis leve a una conjuntivitis folicular crónica), Estadio 3 (conjuntivitis folicular con hiperplasia marcada del tejido linfoide del tercer párpado, quemosis y/o secreción ocular purulenta) y Estadio 4 (conjuntivitis folicular crónica con posible presencia de úlcera corneal) (**Tabla XI**).

En los gatos, se definieron los siguientes estadios clínicos: Estadio 1 (ausencia de signos clínicos), Estadio 2 (conjuntivitis leve con secreción ocular y/o blefaritis), Estadio 3 (conjuntivitis complicada, queratitis, quemosis y/o secreción ocular purulenta) (**Tabla XII**).

Tabla XI. Clasificación clínica de la thelaziosis canina

Estadio clínico	Descripción	Signos oculares	
Estadio I	<b>Sin signos clínicos</b>		
	Ausencia de epífora y exudado ocular, ojo hidratado con la córnea lisa, brillante, transparente y sin vasos. La coloración de la conjuntiva es similar a otras mucosas. Aspecto normal de la córnea, sin hiperplasia del tejido linfoide de la cara bulbar del tercer párpado.		
Estadio II	<b>De conjuntivitis leve a conjuntivitis folicular crónica</b>		
	Congestión/hiperemia conjuntival, descarga serosa o seromucosa. Conjuntivitis folicular, congestión conjuntival marcada, hiperplasia del tejido linfoide del tercer párpado, tanto en la cara bulbar como en la palpebral, procidencia del tercer párpado.		
Estadio III	<b>Conjuntivitis folicular crónica complicada</b>		
	Blefaroespasma, conjuntivitis folicular marcada, con hiperplasia del tejido linfoide del tercer párpado. Foliculos que sangran con facilidad, procidencia del tercer párpado, quemosis y descarga ocular purulenta.		
Estadio IV	<b>Conjuntivitis folicular crónica con úlcera corneal</b>		
	Conjuntivitis folicular marcada, con foliculos que sangran con facilidad, descarga ocular purulenta, con o sin blefaritis. Blefaroespasma, fotofobia, procidencia del tercer párpado y presencia de úlcera corneal.		

**Tabla XII.** Clasificación clínica de la thelaziosis felina

Estadio clínico	Descripción	Signos oculares
<b>Estadio I</b>	<b>Sin signos clínicos</b>	
	Ausencia de signos oculares. Aspecto normal de la córnea, ausencia de secreciones.	
<b>Estadio II</b>	<b>De conjuntivitis de leve a moderada</b>	
	Conjuntivitis moderada. Congestión/hiperemia conjuntival, descarga serosa, epífora, presencia de legaña	
<b>Estadio III</b>	<b>Conjuntivitis crónica complicada</b>	
	Blefaroespasma, conjuntivitis folicular marcada, con hiperplasia del tejido linfoide, descarga ocular purulenta, procidencia del tercer párpado y posible presencia de úlcera corneal.	

#### 4.3. Recolección e identificación morfológica y molecular de *Thelazia* spp.

En caso de observarse vermes, éstos eran recogidos en un tubo *ependorf* con alcohol de 70° hasta su traslado al laboratorio del Departamento de Sanidad Animal (**Fig. 28b**).

Una vez allí, se procedió a la identificación morfológica de los nematodos como ejemplares de *T. callipaeda* siguiendo las claves morfológicas descritas por Otranto *et al.* (2003). Además, se cuantificó el número de vermes encontrados en ambos ojos de todos los animales. Se diferenció entre machos y hembras, teniendo en cuenta la posición de la vulva anterior a la unión esófago-intestinal en las hembras y la presencia de cinco pares de papilas postcloacales en los machos. En ocasiones se empleó lactofenol de Amman (400 g de ácido carbónico, 400 ml de ácido láctico, 800 ml de glicerol, 400 ml de agua)

para aclarar los vermes y mejorar la visualización al microscopio de las estructuras anatómicas necesarias para su identificación.

Se extrajo ADN genómico de algunos nematodos ( $n = 2$ ) aislados de dos moscas, utilizando un kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Alemania). La extracción de ADN se realizó en el Dpto. de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid (UCM). Una secuencia parcial del gen de la subunidad 1 de la oxidasa del citocromo c mitocondrial (*cox1*, ~ 689 pb) fue amplificada por PCR para la detección de ADN de *T. callipaeda* como se describe en un estudio previo (Otranto *et al.*, 2005c). El análisis molecular fue realizado por el equipo del Prof. Otranto en el Dpto. de Enfermedades Infecciosas de la “Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Università degli Studi di Bari” (Italia).

#### **4.4. Análisis espacial de los casos de infección por *Thelazia callipaeda* en España**

Se utilizó el programa informático ArcGis Pro v.2.3.3 [Instituto de Investigación de Sistemas Ambientales (ESRI), Redlands, CA, EE. UU.] para realizar los mapas epidemiológicos. El número de casos positivos por *T. callipaeda* en cada sitio fue geocodificado y representado como un círculo, cuyo tamaño fue proporcional al número de casos detectados en cada sitio en cuestión. Además, los casos registrados fueron clasificados como autóctonos cuando el animal no había viajado a otras partes del país (círculo rojo), o como importados si tenían historial de viaje a otras áreas conocidas como endémicas (círculo verde).

#### **4.5. Captura, identificación morfológica y molecular de los especímenes de *Phortica* spp.**

Los muestreos entomológicos se programaron quincenalmente o mensualmente. Las moscas fueron recolectadas manualmente mediante el uso de redes cazamariposas por la técnica de manguero (**Fig. 29a**) y posteriormente transferidas a jaulas de mantenimiento de adultos (con dimensiones de 20 x 20 x 20 cm y compuestas por una

mallas con un tamaño de luz de 0,4 mm<sup>2</sup>) (**Fig. 29b**) para ser transportadas hasta el laboratorio. En la parte superior de la jaula se colocaron varios trozos de manzana cortados en láminas como alimento para las moscas (**Fig. 29b**) y se cubrió la caja con una tela mojada para mantener la humedad.



**Figura 29.** Método de captura de ejemplares de *Phortica variegata*. **29a.** Manguero utilizando un cebo humano. **29b.** Jaula utilizada para almacenar las moscas.

En cada muestreo, se registraron las principales variables microclimáticas, temperatura (°C) y humedad relativa HR (%), mediante un termohigrómetro (PCE-MHT 1, PCE Instruments, Southampton, Reino Unido) (**Fig. 30**).



**Figura 30.** Termohigrómetro (PCE-MHT 1, PCE Instruments, Southampton, Reino Unido) utilizado para la medición de la temperatura y la humedad relativa.

A su vez se recogieron las variables macroclimáticas (temperatura máxima, mínima y media diaria, temperatura media y precipitación del mes en curso, y velocidad del viento) obtenidas a través de la base de datos meteorológica de la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) en la estación meteorológica más cercana al sitio de muestreo (“AEMET,” s.f.).

Una vez en el laboratorio, las moscas fueron identificadas mediante lupa binocular (Stemi DV4<sup>®</sup>), siguiendo las claves morfológicas descritas por Otranto *et al.* (2003) y Bächli *et al.* (2004), que incluyen anillos pálidos alrededor de los ojos, tibias amarillas con tres bandas oscuras y manchas grises en el tórax (**Fig. 31**). Siguiendo estas mismas claves también se determinó el sexo de cada espécimen capturado, en función de la morfología de la porción terminal del abdomen (cónica en las hembras y curvada en los machos). Las moscas pertenecientes a otros géneros fueron desechadas.



**Figura 31.** Macho y hembra adultos de *Phortica variegata* observados al estereomicroscopio.

Además de la identificación morfológica, las moscas recolectadas se diseccionaron y observaron por estereomicroscopía con el objetivo de buscar estadios larvarios de *T. callipaeda* en diferentes localizaciones anatómicas. Para la disección se utilizaron agujas entomológicas (Austerlitz®) de 0,2 mm de diámetro unidas al extremo de un palo de madera. La inspección comenzó por la proboscis, donde se pueden encontrar las L3 infectantes (**Fig. 2** de la publicación 5.1.). A continuación, se diseccionó la cabeza y el tórax en busca de L3 en migración. Y, por último, se inspeccionó el abdomen, donde podrían encontrarse L1 enquistadas (en los testículos en el caso de los machos o en la cavidad abdominal en las hembras) y/o L2. Una vez diseccionados, los ejemplares de *P. variegata* capturados, se conservaron en tubos *ependorf* con alcohol de 70° para poder proceder posteriormente al diagnóstico molecular.

De algunas moscas recolectadas en la región de la Vera se extrajo el ADN mediante el mismo kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) descrito anteriormente en la sección 4.3 (páginas 104-105). Posteriormente, para confirmar la identificación de las moscas como *P. variegata*, las muestras recolectadas fueron sometidas a PCR y secuenciación, como se describe por otros autores

(Otranto *et al.*, 2008b). En resumen, los amplicones se purificaron utilizando columnas Ultrafree-DA (Amicon, Millipore, Bedford, MA, EE. UU.) y se secuenciaron directamente con el kit Taq DyeDeoxyTerminator (v.2, Applied Biosystems, Foster, California, EE. UU.) en un secuenciador automático (ABI-PRISM 377, Applied Biosistemas). Las secuencias se alinearon utilizando el software Geneious R9 (“Molecular Biology and NGS Analysis Tools,” s.f.) y se compararon (BLASTn) con las secuencias disponibles en GenBank (“NCBI,” s.f.). Nuevamente, el análisis molecular fue realizado por el equipo del Prof. Otranto en el Dpto. de Enfermedades Infecciosas de la “Facoltà di Medicina Veterinaria dell’Università degli Studi di Bari” (Italia).

#### **4.6. Análisis estadístico**

El procesamiento y análisis de los resultados obtenidos se detallan específicamente en cada publicación. El análisis estadístico se realizó con el apoyo del Centro de Proceso de Datos de la Universidad Complutense de Madrid. Se utilizaron los programas estadísticos SAS (versión 9.4.) y SPSS (versión 25.0 IBM, Nueva York, USA).

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% cuando el valor  $p$  fue menor de 0,05.

## **5. RESULTADOS: *PUBLICACIONES CIENTÍFICAS***

---



## 5. RESULTADOS: *PUBLICACIONES CIENTÍFICAS*

En la siguiente sección se recogen los resultados de los objetivos propuestos a lo largo de esta memoria y alcanzados a través de la publicación de cinco artículos científicos. En algunos casos, dentro del mismo artículo, se han analizado más objetivos y, para favorecer la lectura, se ha trabajado con un código de color para representar los mismos.

### 5.1. Detection of *Thelazia callipaeda* in *Phortica variegata* and spread of canine thelaziosis to new areas in Spain

En este artículo se desarrollaron los tres objetivos específicos relacionados con el vector:

- i. Estudiar el papel vectorial de *Phortica variegata* en España.
- ii. Determinar la presencia y abundancia de *Phortica variegata* en los focos autóctonos detectados de infección por *Thelazia callipaeda*.
- iii. Determinar las variables ambientales que influyen sobre la abundancia de *Phortica variegata* y su dinámica estacional.

Y uno relacionado con el hospedador canino:

- i. Determinar la prevalencia actual de la thelaziosis canina en áreas endémicas de España.

La información sobre el papel del vector en condiciones naturales era limitada. El rango de distribución de esta infección está relacionado con el de su vector, *P. variegata* (Otranto *et al.*, 2005a, 2006b). Los datos sobre la distribución geográfica de *P. variegata* se limitaba a las denuncias de los lugares donde fueron detectados estos dípteros (Kozlov, 1963; Máca, 1977; Máca y Lin, 1993; Bächli *et al.*, 2004; Werner y Jaenike, 2017; Otranto *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2019).

Hasta la fecha, solo en Italia se había demostrado que *P. variegata* actuaba como vector de *T. callipaeda* en condiciones naturales (Otranto *et al.*, 2006a, 2006b), aunque esta drosophila también se haya detectado en otros países europeos donde se ha denunciado la presencia de casos autóctonos de la infección (Otranto *et al.*, 2006b, 2018; Roggero *et al.*, 2010; Čabanová *et al.*, 2018; Palfreyman *et al.*, 2018).

En consecuencia, en este estudio se investigó el papel vectorial de *P. variegata* en la infección por *T. callipaeda* en España. Además, en este artículo y en la publicación 5.2., se estudiaron las variables ambientales que influyen sobre la abundancia de *P. variegata*, así como su dinámica estacional. Finalmente, se comunican los resultados del primer estudio de prevalencia en perros que se realizó en el ámbito de la presente Tesis Doctoral.

Los sitios de muestreo fueron:

Área de estudio 1. La Vera (Cáceres).

Área de estudio 2. El Escorial (noroeste de la Comunidad de Madrid).

Área de estudio 3. Miraflores de la Sierra (noroeste de la Comunidad de Madrid).

Se recolectaron un total de 2162 ejemplares de *Phortica* spp. (1722 machos y 489 hembras) en los tres sitios objeto de la investigación.

En todos los lugares, el porcentaje total de machos de *Phortica* (79,65%) fue significativamente mayor que el de hembras (20,35%).

Se observó una correlación positiva moderada entre el porcentaje de machos recolectados y la temperatura registrada en el momento de la captura. La densidad de moscas también se correlacionó positivamente con la temperatura mínima y media diaria, y con la temperatura media mensual.

Tras la disección de los especímenes recolectados, se detectaron dos L3 de *T. callipaeda*, una en cada proboscis de dos moscas recolectadas en La Vera. Además, se realizó el análisis molecular de 371 especímenes procedentes de La Vera que se identificaron como *P. variegata* y en 28 (7,5%) se detectó ADN del haplotipo 1 de *T. callipaeda*.

Asimismo, se examinaron un total de 287 perros en los tres sitios de muestreo, y de estos, 115 (40,1%) estaban infectados por *T. callipaeda*. En las áreas de estudio 1, 2 y 3, el número de perros autóctonos infectados fue de 51/75 (68%), 23/88 (26,1%) y 41/124 (33,1%), respectivamente.

**Publicación científica:**

**Marino, V., Gálvez, R., Colella, V., Sarquis, J., Checa, R., Montoya, A., Barrera, J.P., Domínguez, S., Lia, R.P., Otranto, D., Miró, G. (2018).** Detection of *Thelazia callipaeda* in *Phortica variegata* and spread of canine thelaziosis to new areas in Spain. *Parasit. Vectors* 11, 195. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2773-0>

**Índice de impacto y posición de la revista en el área JCR (en su año de publicación):**

- Índice de impacto: 3,031
- Cuartil: Q1

Fuente: <https://www.recursoscientificos.fecyt.es/>

RESEARCH

Open Access



# Detection of *Thelazia callipaeda* in *Phortica variegata* and spread of canine thelaziosis to new areas in Spain

Valentina Marino<sup>1</sup>, Rosa Gálvez<sup>1</sup>, Vito Colella<sup>2</sup>, Juliana Sarquis<sup>1</sup>, Rocío Checa<sup>1</sup>, Ana Montoya<sup>1</sup>, Juan P. Barrera<sup>1</sup>, Sonia Domínguez<sup>1</sup>, Riccardo Paolo Lia<sup>2</sup>, Domenico Otranto<sup>2</sup> and Guadalupe Miró<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** The fruit fly *Phortica variegata* (Drosophilidae: Steganinae) feeds on the ocular secretions of animals and humans, and has been described as an intermediate host of the eye worm *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae) in Italy. Despite the increased detection of *T. callipaeda* in many European countries, information about its vector role in natural conditions is still limited. In the Iberian Peninsula, thelaziosis caused by *T. callipaeda* has been reported in dogs, cats, red foxes, wild rabbits and humans.

**Methods:** In the last seven years, we have detected increased numbers of cases of canine thelaziosis at three locations in mainland Spain: Site 1, La Vera region (Cáceres Province, central-western Spain; 51 cases); Site 2, El Escorial municipality (Madrid Community, central Spain; 23 cases); and Site 3, Miraflores de la Sierra municipality (Madrid Community, central Spain; 41 cases). Site 1 is considered endemic for *T. callipaeda* while the other two sites have been recently recognised as risk zones for *T. callipaeda* infection.

**Results:** From June 2016 to September 2017, 2162 flies were collected and morphologically identified as *Phortica* spp. (Site 1,  $n = 395$ ; Site 2,  $n = 1544$ ; and Site 3,  $n = 223$ ). Upon dissection, third-stage *T. callipaeda* larvae were found in two out of 155 flies examined from Site 1, and both these larvae tested molecularly positive for the eye worm. Of the 395 flies collected from Site 1, 371 were molecularly processed for arthropod species identification and *T. callipaeda* detection. All 371 flies were identified as *P. variegata* and 28 (7.5%; 95% CI: 4.8–10%) tested positive for *T. callipaeda* DNA haplotype 1.

**Conclusions:** Our findings indicate that *T. callipaeda* circulates among dogs and *P. variegata* in Spain, where zoonotic cases have been also reported. The co-existence of canine thelaziosis and *Phortica* spp. in geographical areas previously considered free of the eye worm indicates a risk of infection for both animals and humans living in this region.

**Keywords:** *Phortica variegata*, Flies, Vector, *Thelazia callipaeda*, Eyeworms, Autochthonous cases, PCR, Spain

## Background

*Thelazia callipaeda*, Railliet & Henry, 1910 (Spirurida: Thelaziidae) is a nematode that causes eye infection in several mammals, including humans. In their definitive hosts, adult parasites are responsible for subclinical to clinical ocular thelaziosis [1]. The clinical picture produced is mostly the outcome of mechanical damage to the

conjunctival and corneal epithelium caused by the eye worm's serrated cuticle, and of the burden of adult nematodes inhabiting the conjunctival sac [1]. The most common clinical signs are conjunctivitis followed by lachrymal discharge, epiphora and in severe cases, keratitis, corneal opacity or ulcers [1].

*Thelazia callipaeda* infection has been described not only in dogs and cats but also in red foxes (*Vulpes vulpes*), gray wolves (*Canis lupus*), beech martens (*Martes foina*), brown hares (*Lepus europaeus*) and wild cats (*Felis silvestris*) [2]. In the Iberian Peninsula,

\* Correspondence: [gmiro@ucm.es](mailto:gmiro@ucm.es)

<sup>1</sup>Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

thelaziosis caused by *T. callipaeda* has been detected in red foxes [3, 4] and wild rabbits [5].

Based on initial reports and the high number of cases of *T. callipaeda* in Asia [6, 7], the parasite is known as “the oriental eye worm”. In Asian countries, human thelaziosis is considered a neglected zoonotic disease due to the high number of cases reported amongst people living in poor and rural areas [8]. In Europe, cases of human thelaziosis have been described in Italy and France [9], Spain [10–12], and more recently, in Croatia and Serbia [13, 14].

In Spain, the first autochthonous case of ocular thelaziosis was reported in 2010 in a dog that had spent a few weeks in the region of La Vera (Cáceres Province, western Spain) [15]. Following further reported cases of canine thelaziosis in this region [16], the geographical area is now considered endemic for canine thelaziosis. Prevalences recorded in dogs of La Vera and bordering areas (provinces of Salamanca, Ávila and Toledo) have been estimated at around 40% [17, 18]. Of note, in 2012 the first case of feline thelaziosis was detected in La Vera [19].

The distributional range of this nematode infection is thought to be related to that of its vector and intermediate host, *Phortica variegata* Fallén, 1823 (Drosophilidae: Steganinae) [20–22]. This non-biting fruit fly usually feeds on fermenting fruits and other vegetables, though males display zoophilic behaviour [21]. *Phortica variegata* and *Phortica okadai* Okada, 1956 have been described as vectors of *T. callipaeda* in Europe and China, respectively [20, 22]. Under experimental conditions, both males and females can act as vectors of *T. callipaeda* [20], but in natural conditions, only males have been observed to transmit infective third-stage larvae (L3) to the definitive host [21]. To date, reports exist of *P. variegata* acting as intermediate host and vector of *T. callipaeda* under natural conditions only in Italy, although the fruit fly has also been detected in other European countries where autochthonous infections of *T. callipaeda* have been reported [17, 23].

However, while *P. variegata* is the main vector candidate for *T. callipaeda* in European countries, others species like *Phortica semivirgo* Máca, 1977 are thought to play a role in the transmission of this eye worm [24]. Furthermore, owing to the similar taxonomic characters of adult worms of *P. variegata* and *P. semivirgo*, identification based only on morphology is difficult and requires specific technical skills (reviewed in [25]).

In this paper, we describe the detection of *P. variegata* specimens naturally infected with *T. callipaeda* in Spain. In addition, we report 115 new cases of canine thelaziosis in three locations of Spain, and assess the seasonal distribution of *Phortica* spp. in these areas.

## Methods

### Sampling sites

Flies were collected in three different areas of the Iberian Peninsula where cases of thelaziosis in dogs and cats have been reported. The collection sites were designated as:

- Site 1. La Vera region (northern Cáceres Province); central-western Spain (40°9'41"N, 5°23'13"W); altitude 472 m above sea level (masl);
- Site 2. El Escorial municipality (northwest Madrid Community); Sierra de Guadarrama (40°36'10"N, 4°7'22"W); altitude 946 masl;
- Site 3. Miraflores de la Sierra municipality (northwest Madrid Community); Sierra de Guadarrama (40°48'54"N, 3°46'15"W); altitude 1147 masl.

At the three study sites, climate and vegetation are typically Mediterranean. Thus, summers are hot and dry, and maximum rainfall is recorded in autumn and spring. The vegetation in these mountainous regions consists of pines (*Pinus brutia*) and holm oaks (*Quercus ilex*) in lower areas, and pasture and shrublands in high mountain areas. La Vera region borders with land given over to fruit production (apples, pears, figs, blueberries, raspberries and vineyards). At the three sites, mammals such as deer (*Cervus elaphus*), wild boar (*Sus scrofa*), roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*), badgers (*Meles meles*), mustelids, wild cats (*Felis silvestris*), red foxes (*Vulpes vulpes*), gray wolves (*Canis lupus*) and hares (*Lepus europaeus*) abound [26, 27].

### Climate data collection

Temperatures (°C) and relative humidity, RH (%), were recorded using a thermohygrometer (PCE-MHT 1, PCE Instruments, Southampton, UK). Each sampling site was also assigned macroclimate variables (maximum, minimum and average daily temperature, average temperature and precipitation of the current month, and wind speed) provided by the Spanish Meteorological Agency (AEMet) for the closest meteorological station [28].

### Diagnosis of thelaziosis in dogs

All surveyed dogs were subjected to ocular examination after the administration of anaesthetic eye drops (tetracaine hydrochloride and naphazoline hydrochloride). *Thelazia callipaeda* eye worms were collected from the conjunctival sac of infected dogs using sterile cotton swabs or by flushing with physiological saline solution. In total, 287 dogs were examined at the three sites. At Site 1, where a prevalence of 40% had been previously reported for this thelaziosis [17], a population of 75 hunting dogs living outdoors was selected and classified as consisting of “high-risk owned dogs”. At Sites 2 and 3, where veterinarians had reported cases of thelaziosis

both in dogs and cats (Guadalupe Miró, unpublished observations), 88 and 124 owned dogs were actively sampled, respectively. Animals sampled at Sites 2 and 3 were pets classified as “low-risk owned dogs”.

#### Fly collection, processing and morphological identification

Non-biting flies were netted with a butterfly net around the eyes of dogs and humans (Fig. 1a). Although trapping is a valid technique, it is not specific and large numbers of other drosophilids may be captured. While time-consuming, netting is a cheap and ready-to-use method.

Flies were captured over a period of about 1 h, usually in the morning. Captured flies were stored in a 20 × 20 × 20 cm cage made from a 0.4 mm<sup>2</sup> pore-size mesh (Fig. 1b) and transferred to our laboratory at the Department of Animal Health (Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid) for identification (Fig. 2). The density of flies was calculated as the number of specimens captured over the recorded sampling time.

To detect the presence of L3 *T. callipaeda* larvae in the flies’ proboscis, collected specimens of *Phortica* spp. were examined by dissection and visual inspection. Only live flies were dissected in a drop of physiological saline. Dead specimens were stored individually in 70% ethanol. Morphologically identified *Phortica* spp. flies from Site 1 were also subjected to molecular analyses. All flies (dissected or not) were sexed according to the morphology of the terminal part of the abdomen and stored in 70% ethanol in individual vials for further analyses.

Morphological identification was performed under a stereomicroscope (Stemi DV4<sup>®</sup>, Carl Zeiss, Göttingen,

Germany) on the basis of taxonomic characters, such as a pale ring around the eyes, yellow tibiae with three dark bands and gray spots on the thorax (Fig. 2) [25, 29]. The unequivocal identification of the species *P. variegata* and *P. semivirgo* is challenging and relies upon the appearance of the terminalia of males and females [25, 29]. The features looked for are the number of sensilla on each medial and dorsal branch of the anterior parameres of the genitalia (3 on each branch for *P. variegata*, 3–5 for *P. semivirgo*) and the pale ring around the eyes (brownish around the lower half of the eye for *P. variegata*, pale yellow along the whole eye margin for *P. semivirgo*). Some authors have also described intermediate forms in terms of morphological characters for these two species [23]. The proboscis was dissected to retrieve infective *T. callipaeda* larvae, and the abdomen, in particular the terminalia of males, to retrieve different larval stages of *T. callipaeda*. The number and location of larvae in the body of flies were recorded and the larvae were also identified using morphological keys [20, 30]. Collected *T. callipaeda* larvae were measured and photographed.

#### DNA extraction, PCR and sequencing

Genomic DNA was extracted from individual flies ( $n = 371$ ) and from nematodes ( $n = 2$ ) isolated from two flies, using a commercial kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany). A partial sequence of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene (*cox1*, ~689 bp) was amplified by PCR for the detection of *T. callipaeda* DNA as described in a previous study [31]. To confirm the identification of the flies as *P. variegata*, specimens collected from Site 1 ( $n = 371/395$ ) were subjected to PCR and sequencing, as described elsewhere [32]. In brief, amplicons were purified using Ultrafree-DA columns



**Fig. 1** a Netting procedure. b Cage (20 × 20 × 20 cm) used to store the *Phortica* flies



**Fig. 2** Male *P. variegata*, lateral view, showing: **a** pale ring around the eyes; **b** yellow tibiae with three dark bands; **c** grey spots on the thorax and **d** third-stage *T. callipaeda* larva in the proboscis

(Amicon, Millipore, Bedford, MA, USA) and sequenced directly with the Taq DyeDeoxyTerminator Cycle Sequencing Kit (v.2, Applied Biosystems, Foster, California, USA) in an automated sequencer (ABI-PRISM 377, Applied Biosystems). Sequences were aligned using the Geneious R9 software package [33] and compared (BLASTn) with those available in GenBank [34].

### Statistical analysis

Fly densities were recorded as the number of flies collected in one hour. A descriptive analysis of the main numerical variables recorded (temperature, relative humidity, rainfall, wind speed, density of flies and percentage of males) was performed using mean and standard deviation (SD) or medians and quartile ranges for quantitative variables. Fly density and male percentage were assigned as the dependent variables. Interaction between these two dependent variables and the climate data (independent quantitative variables) was assessed using Spearman's correlation coefficient. For this analysis we used the SPSS 22 statistics package for Windows. Significance was set at  $P \leq 0.05$ .

## Results

### Dogs

Of the 287 dogs examined at the three sites, 115 (40.1%, 95% CI: 34.6–45.8%) were found to be infected by *T. callipaeda*. At Sites 1, 2 and 3, the numbers of infected autochthonous dogs were 51 of 75 (68%, 95% CI: 56.8–77.5%), 23 of 88 (26.1%, 95% CI: 18.1–36.2%) and 41 of 124 (33.1%, 95% CI: 25.4–41.7%), respectively. There were significant differences in prevalence between the groups of dogs from the three sites ( $\chi^2 = 34.012$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.05$ ).

Most infected animals presented ocular signs ( $n = 69$ ; 60%) whereas no clinical signs were observed in 46 dogs (40%). The clinical signs most frequently observed were conjunctivitis ( $n = 59$ ; 85.5%), petechiae and oedema ( $n = 4$ ; 5.8%), keratitis ( $n = 3$ ; 4.3%) and epiphora ( $n = 3$ ; 4.3%).

### Fly collection and seasonal survey

In total, 2162 flies (1722 males and 489 females) were collected at the three sites surveyed (Tables 1, 2 and 3). All flies were morphologically identified as belonging to the genus *Phortica*. Climate data and densities of *Phortica* spp. captured at Sites 1, 2 and 3 are reported in Tables 1, 2 and 3, respectively.

The numbers of *Phortica* spp. flies captured at each site over different sampling periods (given in parentheses) were: Site 1 (May–September 2017,  $n = 395$ ); Site 2 (total  $n = 1544$ ; June–November 2016,  $n = 1410$ ; April–September 2017,  $n = 134$ ); and Site 3 (total  $n = 223$ ; September 2016,  $n = 144$ ; June–September 2017,  $n = 79$ ).

Overall, *Phortica* spp. specimens were found in peri-urban areas characterised by a maximum daily temperature of 35.7 °C (Site 1) and a minimum daily temperature of 2.8 °C (Site 3). The lowest average daily temperature recorded was 11.8 °C in April 2017 for Site 2; in these conditions an average of 5.3 flies/h could be collected. No flies were collected when the average daily temperature was 8.8 °C (November 2016). The highest numbers of *Phortica* spp. were recorded in August at Site 2, when the average monthly temperature was higher (26 °C in 2016 and 24.5 °C in 2017) (Fig. 3). In all places, the total percentage of male *Phortica* flies (79.65%) was significantly higher than females (20.35%).

**Table 1** Density of *Phortica* spp. captured ( $n = 395$ ) in 2017 at Site 1 (La Vera) and climate variables

Month	Microclimate variables		Macroclimate variables					Fly density (flies captured per h)	
	$T_{set}$	$RH_{set}$	$T_{max}$ daily	$T_{min}$ daily	$T_{mean}$ daily	$T_{mean}$ monthly	Rainfall monthly (mm)	Males	Females
May 2017	32.9	24.3	32.0	17.0	24.5	19.8	16.4	11	0.5
June 2017	33.8	28.8	35.7	21.0	28.4	25.7	12.8	33	0
July 2017	33.6	24.1	35.0	18.0	26.5	26.6	38.0	113.3	3.3
August 2017	26.7	43	27.9	13.6	20.8	27.2	48.0	92	3
September 2017	32.8	29.8	31.4	17.0	24.2	23.1	0	84	8

Abbreviations:  $T$  temperature ( $^{\circ}C$ ),  $RH$  relative humidity (%),  $T_{set}$  Temperature recorded at the time of capture,  $RH_{set}$  relative humidity recorded at the time of capture,  $T_{max}$  maximum temperature,  $T_{min}$  minimum temperature,  $T_{mean}$  mean temperature

At Site 1, numbers of captured *Phortica* spp. peaked in July, August and September; 96% of specimens being male ( $n = 380/395$ ). At Site 2, 74.4% ( $n = 1049/1410$ ) of *Phortica* spp. captured in 2016 were males, and females were increasingly collected in September and October of this year. In 2017, the proportion of male flies captured at this site was 93.3% ( $n = 125/134$ ) (Fig. 3). At Site 3, the percentage of male flies collected in September 2016 was 63.2% ( $n = 92/144$ ). The percentage of male flies collected from June to September the following year (2017) was 96.2% ( $n = 76/79$ ).

#### Bivariate analysis

Positive moderate correlation was observed between the percentage of male fly specimens collected and the temperature recorded at the time of capture ( $r_{(17)} = 0.53$ ,  $P = 0.02$ ). Fly density was also positively correlated with minimum and mean daily temperature, respectively ( $r_{(24)} = 0.45$ ,  $P = 0.02$  and  $r_{(24)} = 0.42$ ,  $P = 0.04$ ), and

with the mean temperature of the current month, although this time without significance ( $r_{(24)} = 0.50$ ,  $P = 0.11$ ). Fly density and the percentage of male flies showed negative correlation ( $r_{(23)} = -0.44$ ,  $P = 0.03$ ). No correlations emerged between neither of the dependent variables (fly density and percentage males) and  $RH$  at the time of capture, maximum daily temperature, average monthly rainfall and wind speed (Table 4).

#### Detection of *Thelazia callipaeda* in *Phortica variegata*

The numbers of flies that were still alive at the time of dissection were 155 (39.2%), 1088 (70.5%) and 202 (90.6%) for Sites 1, 2 and 3, respectively. Upon dissection, one *T. callipaeda* L3 was detected in each proboscis of two flies collected at Site 1 (Fig. 2), while no flies from Sites 2 and 3 were found to be infected by *T. callipaeda*.

Twenty eight of 371 *Phortica* flies from Site 1 that were molecularly processed (7.5%; 95% CI: 4.8–10%)

**Table 2** Density of *Phortica* spp. captured ( $n = 1544$ ) at Site 2 (El Escorial) and climate variables

Month	Microclimate variables		Macroclimate variables					Fly density (flies captured per h)	
	$T_{set}$	$RH_{set}$	$T_{max}$ daily	$T_{min}$ daily	$T_{mean}$ daily	$T_{mean}$ monthly	Rainfall monthly (mm)	Males	Females
June 2016	–	–	30.9	13.6	22.3	21.3	40.0	44.0	0.4
June 2016 <sup>a</sup>	–	–	35.1	19.6	27.3	21.3	40.0	86.0	3.5
July 2016	–	–	29.3	10.7	20	24.0	34.8	91.5	0
August 2016	28.4	31.7	33.7	18.4	26.1	26.0	3.6	137.2	2.0
September 2016	25.2	24.4	27.7	14.1	20.9	21.2	14.8	56.5	60.5
October 2016	26.2	26.9	25.0	10.6	17.8	16.1	276.0	43.2	74.4
October 2016 <sup>a</sup>	22.0	29.8	23.5	8.9	16.2	16.1	276.0	13.3	27.3
November 2016	–	–	13.8	3.7	8.8	8.6	186.8	0	0
April 2017	–	–	18.8	4.8	11.8	14.3	32.4	5.3	0
May 2017	29.0	32.4	30.8	17.2	24.0	17.9	29.4	10.4	0
June 2017	26.3	32.1	26.9	15.8	21.3	24.2	31.2	33.3	0
July 2017	26.2	25.2	30.3	15.1	22.7	24.6	188.6	16.0	0
August 2017	28.2	35.3	32.2	17.5	24.9	24.5	49.4	112.0	2.0
September 2017	24.0	23.4	24.9	16.6	20.8	20.3	0	38.0	16.0

<sup>a</sup>More than one sampling in the same month

Abbreviations:  $T$  temperature ( $^{\circ}C$ ),  $RH$  relative humidity (%),  $T_{set}$  temperature recorded at the time of capture,  $RH_{set}$  relative humidity recorded at the time of capture,  $T_{max}$  maximum temperature,  $T_{min}$  minimum temperature,  $T_{mean}$  mean temperature

**Table 3** Density of *Phortica* spp. captured ( $n = 223$ ) at Site 3 (Miraflores de la Sierra) and climate variables

Month	Microclimate variables		Macroclimate variables					Fly density (flies captured per h)	
	$T_{set}$	$RH_{set}$	$T_{max}$ daily	$T_{min}$ daily	$T_{mean}$ daily	$T_{mean}$ monthly	Rainfall monthly (mm)	Males	Females
September 2016	23.3	24.4	25.4	3.9	14.6	16.4	16.4	46	26
June 2017	30.0	24.5	28.5	5.2	16.8	19.2	59.6	10	0
July 2017	26.3	36.9	30.8	9.0	19.9	19.5	85.6	66	1
August 2017	-	-	31.2	9.0	20.1	19.5	132.4	6	0
September 2017	-	-	24.7	2.8	13.8	15.0	9.6	4	4

Abbreviations:  $T$  temperature (°C),  $RH$  relative humidity (%),  $T_{set}$  temperature recorded at the time of capture,  $RH_{set}$  relative humidity recorded at the time of capture,  $T_{max}$  maximum temperature,  $T_{min}$  minimum temperature,  $T_{mean}$  mean temperature

returned a positive result for *T. callipaeda* with sequences 100% identical to those of *T. callipaeda* haplotype 1 (GenBank: AM042549) and to those obtained for the L3 larvae detected ( $n = 2$ ; Fig. 2, Table 5). Insect nucleotide sequences of flies scoring positive for *T. callipaeda* DNA ( $n = 28$ ) were 99–100% identical to those of *P. variegata* (GenBank: EF576934).

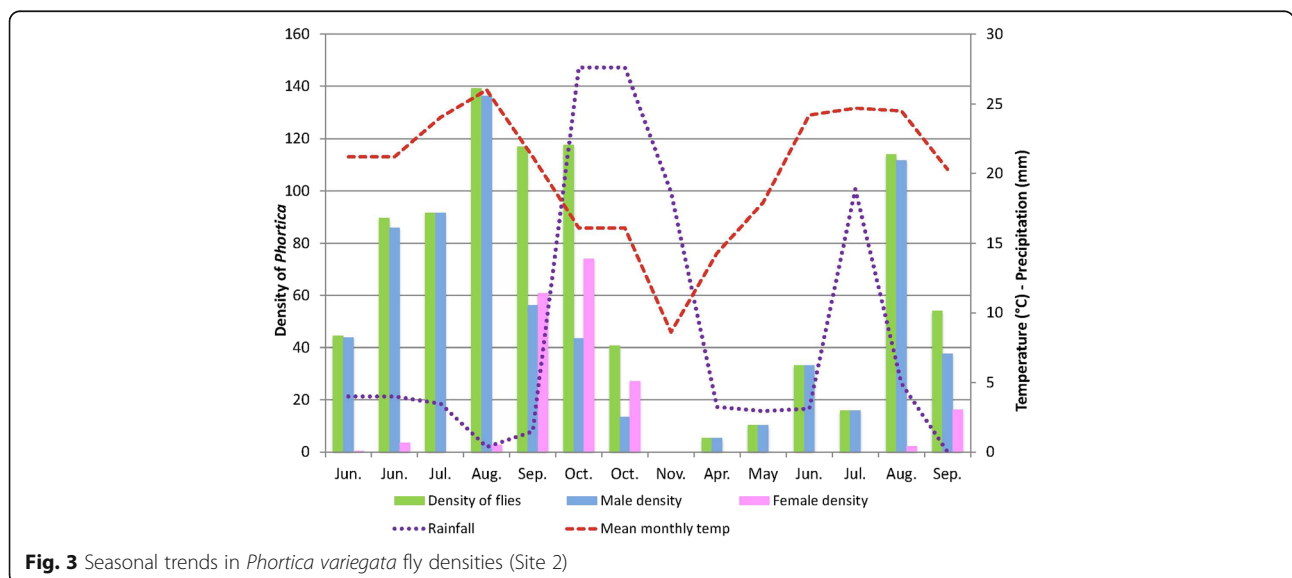
Of the 28 infected flies, one was captured in May ( $n = 1/9$ ; 11.11%), 2 in June ( $n = 2/33$ ; 6.06%), 11 in July ( $n = 11/166$ ; 6.63%) and 14 in August ( $n = 14/95$ ; 14.74%; Table 5).

**Discussion**

In this study, the detection of *T. callipaeda* in *P. variegata* and its potential vectorial role have been described for the first time in Spain. In addition, we report 115 new cases of canine thelaziosis at three localities in Spain, and assess the seasonal distribution of *Phortica* spp. in these areas, thus confirming that this nematode circulates among dogs and flies. The percentage of infected dogs showing clinical signs (i.e. 60%) was considerably higher than that recorded in previous studies (15.4%) [17].

This finding is probably related to the fact that dogs were examined during late stages of infection.

The high prevalence of *T. callipaeda* infection in the dogs from Site 1 (La Vera) was as expected, though still higher (51 out of 75, 68%) than in an earlier report (i.e. 182/456, 40%) [17]. In contrast, the infection prevalences recorded at the other two sites in Madrid, seven years after the detection of the first infection focus (La Vera), were unexpected, as the affected dogs had not travelled to endemic areas. Indeed, these cases represent new areas of expansion of the parasite within a few years. Differences in prevalence between the groups of dogs from the three sites studied were statistically significant and it may be due to the fact that the infection has been established in Sites 2 and 3 only in the last few years. In addition, dogs from the Site 1 were living outdoors and were selected and classified as consisting of “high-risk owned dogs”. Although different animal species (such as red foxes, gray wolves, etc.) have been reported in the three sites, red foxes positive to *Thelazia* spp. have already been recorded only in Site 1 [3]; this may be associated with the higher prevalence of infection at this site.



**Fig. 3** Seasonal trends in *Phortica variegata* fly densities (Site 2)

**Table 4** Climate variables and bivariate factors related to fly density and the percentage of males. Values of coefficient (*r*) and *P*-values obtained by Spearman's correlation analysis

	Fly density	% males	$T_{set}$	RH <sub>set</sub>	$T_{max}$ daily	$T_{min}$ daily	$T_{mean}$ daily	$T_{mean}$ monthly	Wind speed	Rainfall monthly
Fly density	$r_{(23)} = 1$	$r_{(23)} = -0.44$ $P = 0.03^*$	$r_{(17)} = -0.18$ $P = 0.4$	$r_{(17)} = 0.07$ $P = 0.7$	$r_{(24)} = 0.33$ $P = 0.11$	$r_{(24)} = 0.45$ $P = 0.02^*$	$r_{(24)} = 0.42$ $P = 0.004^*$	$r_{(24)} = 0.50$ $P = 0.11$	$r_{(22)} = 0.27$ $P = 0.22$	$r_{(21)} = -0.16$ $P = 0.47$
% Males	$r_{(23)} = -0.44$ $P = 0.03^*$	$r_{(23)} = 1$	$r_{(17)} = -0.53$ $P = 0.02^*$	$r_{(17)} = 0.3$ $P = 0.2$	$r_{(23)} = 0.30$ $P = 0.15$	$r_{(23)} = 0.14$ $P = 0.49$	$r_{(23)} = 0.18$ $P = 0.38$	$r_{(23)} = 0.15$ $P = 0.49$	$r_{(21)} = 0.36$ $P = 0.11$	$r_{(20)} = 0.1$ $P = 0.64$

\* $p < 0.05$

Abbreviations:  $T_{set}$  temperature recorded at the time of capture, RH<sub>set</sub> relative humidity recorded at the time of capture,  $T_{max}$  maximum temperature,  $T_{min}$  minimum temperature,  $T_{mean}$  mean temperature

**Table 5** Number, sex and positive *Phortica* spp. from Site 1 dissected between May and September 2017

Month	No. of flies		Dissection		Molecular analysis	
			Examined (infected) flies		Examined (infected) flies	
	M	F	M	F	M	F
May	22	1	14 (0)	1 (0)	9 (1)	0 (0)
June	33	0	13 (1)	0 (0)	33 (2)	0 (0)
July	170	5	25 (0)	5 (0)	165 (11)	1 (0)
August	92	3	50 (1)	3 (0)	92 (14)	3 (0)
September	63	6	42 (0)	2 (0)	62 (0)	6 (0)
Total	380	15	144 (2)	11 (0)	361 (28)	10 (0)

Abbreviations: F female, M male

Furthermore, the co-occurrence of canine thelaziosis and *Phortica* spp. in areas previously considered free of the parasite determines a risk of infection for animals and humans living in this region, and suggests the likely spread of *T. callipaeda* among dogs in Spain. To the best of our knowledge, reports so far of canine thelaziosis in the Madrid Community only amounted to imported cases from the La Vera region. These new findings indicate a need to now consider these areas of central Spain as autochthonous for canine thelaziosis.

The first report of *T. callipaeda* in *P. variegata* was published in 1963 by Kozlov who described larvae in the proboscis of these fruit flies [21]. In 2002 and 2005, *P. okadaki* and *P. variegata* were described as vectors of *T. callipaeda* in China and southern Europe, respectively [20, 22]. In 2006, *P. variegata* was cited as an intermediate host of *T. callipaeda* [21].

An increase in the occurrence of *T. callipaeda* in western and eastern Europe has been recently described [35]. In Spain, new cases of thelaziosis are steadily rising in different parts of the country [36], though up until now, the occurrence of *T. callipaeda* in *P. variegata* was reported only in Italy [21].

Our collection sites of *Phortica* spp. are at the same latitude as other European countries and China where thelaziosis is endemic in the range 39–46° North, where the dominant vegetation has also been previously associated with the presence of *Phortica* flies [23, 37–45].

The sex ratio of the *Phortica* flies was male-oriented, overall proportions of male flies (1722/2162, 79.6%) being significantly higher than female flies ( $r_{(23)} = -0.44$ ,  $P = 0.03$ ). This predominance of males found around the eyes may be explained by dietary habits (these insects supplement their protein intake for gonadotrophic development; reviewed by Otranto et al. [21]). According to a previous survey [23], by netting around the eyes of dogs, 79.6% of all 2162 *Phortica* collected were males, and there were only a few females, most of them captured at the end of the summer. Contrary to the results obtained by other authors [21], not all of the present

flies collected around the eyes were male. *Phortica* flies feed on ocular secretions mainly in the second half of the season (July–October), which may be because of dietary needs or because of the higher abundance and activity of *Phortica* males in these months [21]. As the total number of flies increases at the end of summer, so does the overall number of females. Notwithstanding the previous studies, there is still a lack of knowledge about the behaviour of these flies especially regarding their feeding requirements. This information may be crucial for the design of preventative measures such as repellent formulations targeted at avoiding the feeding of *Phortica* vectors on infected/uninfected animals.

The length of the activity period of *Phortica* spp. is largely conditioned by climate conditions. Flies were detected from April when average daily temperatures were 11.8 °C and the average monthly temperature was 14.3 °C. The number of flies increased with rising temperatures, peaking in August. Finally, at Site 2 the last specimens were captured in September, in line with previous reports [21, 23]. Peaks of *P. variegata* were recorded in mid-summer (August), with temperature being positively correlated with fly density.

By correlating *Phortica* spp. fly densities with *T. callipaeda* prevalences in dogs, vector densities may be then used to assess the presence of canine thelaziosis in a given area. The prevalence of naturally infected *P. variegata* reported here (i.e. up to 14.7% in August; 14 out of 95 flies captured) is higher than that recorded by Kozlov in 1963 (1.36%) [21] and more recently (2006) by Otranto (1.34%) [21]. We consider that such a high percentage of infected flies could represent a threat, leading to the spread of this parasitosis in Spain. Further studies are needed to confirm this idea and address its consequences.

The molecular approach described in this paper is reliable for detecting species of *Thelazia* in their different vectors avoiding frequent constraints (e.g. time-consuming procedures, operator expertise, sensitivity of the methodology, misidentification). We used this approach to investigate the role of flies as vectors along

with fly dissection and morphological identification of larval stages. In effect, the detection of parasite DNA in arthropod hosts alone is not sufficient proof of their vectorial role or the part played in the ecology of a given vector borne disease. This is because it is not possible to differentiate and even describe larval states in the case of positive results. The molecular characterization of the nematodes examined in the present study served to confirm the identical nature of all *cox1* sequences to those of *T. callipaeda* haplotype 1. This haplotype has been detected in humans and in domestic animals in Europe [20].

In our study, only *P. variegata* males were found to be infected by *T. callipaeda*, thus confirming the hypothesis that only males act as intermediate host under natural conditions [21]. Unlike other drosophilid species, *P. variegata* feeds on the lachrymal secretions of humans and carnivores [25]. The detection of *T. callipaeda* exclusively in male specimens of its arthropod vector is of interest from both parasitological and ecological standpoints, and represents a unique case in which a male drosophilid fly feeding on vertebrate host secretions can transmit a vector-borne pathogen under natural conditions [46].

## Conclusions

We here confirm the occurrence of *P. variegata* in Spain and its potential vectorial role of *T. callipaeda*, posing a threat to animals and humans. The results of this study serve to fill gaps in the knowledge of the biological cycle of *T. callipaeda* in southern Europe and offer new prospects for epidemiological studies on thelaziosis and for the design of appropriate control measures. In addition, autochthonous cases of canine thelaziosis are reported for the first time for new areas in Spain.

## Abbreviations

AEMet: Spanish Meteorological Agency; L3: Third-stage larvae; masl: Meters above sea level; SD: Standard deviation

## Acknowledgements

The authors thank the owners of the dogs and the participating veterinarians for their collaboration. We especially thank Carmen Mascuñán from the "Clínica Veterinaria La Cruz Verde", Inés Domínguez and Clara Zenker from "Clínica Veterinaria La Plaza" for their valuable help with the enrolment and follow-up of clinical cases. Publication of this paper was sponsored by Bayer Animal Health in the framework of the 13th CVBD World Forum Symposium.

## Funding

Not applicable.

## Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

## Authors' contributions

VM performed the field study, processed the samples, carried out the microscopy procedures and drafted the manuscript. RG participated in the diagnostic assays, carried out the statistical analysis of data and reviewed the manuscript. JS, RC and AM participated in the field survey and the diagnostic assays, helping with clinical case enrolment. SD and JB helped with the laboratory work, data collection and with entomological identification. RL contributed to designing the field study and reviewing the manuscript. VC and DO performed the molecular analysis of samples and critically reviewed the manuscript. GM conceived and coordinated the study, participated in its design and the field study, and reviewed the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

The study was carried out in accordance with Animal Protection Spanish Legislation guidelines (Ley 5/2002, Comunidad Autónoma de Extremadura and Ley 4/2016 Comunidad Autónoma de Madrid) and the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. The worms were extracted by the veterinary practitioners with the agreement and in the presence of dogs' owners.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, Bari, Italy.

Received: 6 February 2018 Accepted: 6 March 2018

Published online: 20 March 2018

## References

- Otranto D, Dantas-Torres F, Brianti E, Traversa D, Petrić D, Genchi C, Capelli G. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors*. 2013;6:16.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Mallia E, Di Geronimo PM, Brianti E, Testini G, et al. *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in wild animals: report of new host species and ecological implications. *Vet Parasitol*. 2009;166:262–7.
- Calero-Bernal R, Otranto D, Pérez-Martín JE, Serrano FJ, Reina D. First report of *Thelazia callipaeda* in wildlife from Spain. *J Wildl Dis*. 2013;49:458–60.
- Sargo R, Loureiro F, Catarino AL, Valente J, Silva F, Cardoso L, et al. First report of *Thelazia callipaeda* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *J Zoo Wildl Med*. 2014;45:458–60.
- Gama A, Pires I, Canado M, Coutinho T, Lopes AP, Latrofa MS, et al. First report of *Thelazia callipaeda* infection in wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Portugal. *Parasit Vectors*. 2016;9:236.
- Bhaibulaya M, Prasertsilpa S, Vajrasthira S. *Thelazia callipaeda* Railliet & Henry, 1910, in man and dog in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 1970;19:476–9.
- Shi YE, Han JJ, Yang WY, Wei DX. *Thelazia callipaeda* (Nematoda: Spirurida): transmission by flies from dogs to children in Hubei, China. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82:627.
- Shen J, Gasser RB, Chu D, Wang Z, Yuan X, Cantacessi C, et al. Human thelaziosis - a neglected parasitic disease of the eye. *J Parasitol*. 2006;92:872–6.
- Otranto D, Dutto M. Human thelaziosis, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:647–9.
- Fuentes I, Montes I, Saugar JM, Latrofa S, Gárate T, Otranto D. Thelaziosis in humans, a zoonotic infection, Spain, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:2073–5.
- Gómez-Couso HA-ME, Gómez-Rial MA, Cid-Lama A. Human thelaziosis in Galicia (northwest Spain): report of a clinical case. SOCEPA Congress, Gran Canaria, Spain; 2013.

12. López Medrano R, Guerra Calleja G, Díez Morrondo C, Panadero Fontán R. Ocular thelaziosis, an emergent zoonosis in Spain. *Med Clin (Barc)*. 2015; 145:317–8.
13. Paradžik MT, Samardžić K, Živičnjak T, Martinković F, Janjetović Ž, Miletić-Medved M. *Thelazia callipaeda* first human case of thelaziosis in Croatia. *Wien Klin Wochenschr*. 2016;128:221–3.
14. Tasić-Otašević S, Gabrielli S, Trenkić-Božinović M, Petrović A, Gajić B, Colella V, et al. Eyeworm infections in dogs and in a human patient in Serbia: a One Health approach is needed. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2016; 45:20–2.
15. Guisado A, Sanz F. Conjuntivitis en un perro por *Thelazia callipaeda*. 6th Andalusian Congress of Veterinarians, 5 November 2010, Benalmadena, Malaga, Spain; 2010.
16. VM MA, Hernández L, Dado O, Otranto D, Miro G. Thelaziosis ocular canina. ¿Una parasitosis emergente en España? *Consulta Difus Vet*. 2011;178:43–8.
17. Miró G, Montoya A, Hernández L, Dado D, Vázquez M, Benito M, et al. *Thelazia callipaeda*: infection in dogs: a new parasite for Spain. *Parasit Vectors*. 2011;4:148.
18. Bello A, Hernández L, Checa R, Dado D, Montoya A, Benito M, et al. Situación epidemiológica actual de la thelaziosis ocular canina en España. XXIX AMVAC Congress, 8–11 March 2012, Madrid, Spain; 2012.
19. Hernández L, Montoya A, Checa R, Dado D, Bello A, Vazquez MV, et al. Primera denuncia de la infección por *Thelazia callipaeda* en gatos en España. Madrid: XXIX AMVAC Congress, 8–11 March 2012, Madrid, Spain; 2012.
20. Otranto D, Lia RP, Cantacessi C, Testini G, Troccoli A, Shen JL, et al. Nematode biology and larval development of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in the drosophilid intermediate host in Europe and China. *Parasitology*. 2005;131:847.
21. Otranto D, Cantacessi C, Testini G, Lia RP. *Phortica variegata* as an intermediate host of *Thelazia callipaeda* under natural conditions: evidence for pathogen transmission by a male arthropod vector. *Int J Parasitol*. 2006; 36:1167–73.
22. Wang ZX, Wang KC, Chen Q. Experimental studies on the susceptibility of *Thelazia callipaeda* to *Amiota okadai* in three provinces of China. *Chin J Zoonoses*. 2002;18:61–3.
23. Roggero C, Schaffner F, Bächli G, Mathis A, Schnyder M. Survey of *Phortica* drosophilid flies within and outside of a recently identified transmission area of the eye worm *Thelazia callipaeda* in Switzerland. *Vet Parasitol*. 2010;171:58–67.
24. Cantacessi C, Traversa D, Testini G, Lia RP, Cafarchia C, Máca J, et al. Molecular identification of *Phortica variegata* and *Phortica semivirgo* (Drosophilidae, Steganinae) by PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I gene. *Parasitol Res*. 2008;103:727–30.
25. Bächli G, Vilela CR, Andersson Escher SAS. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark, vol. 39. Leiden: Brill; 2004.
26. Rivas-Martínez S, Loidi Arregui JJ. Biogeography of the Iberian Peninsula. *Itinera Geobotanica*. 1999;13:49–67.
27. Rivas-Martínez S, Rivas-Saez S, Peñas A. Worldwide bioclimatic classification system. *Gobal Geobotany*. 2011;1:1634.
28. Base de datos Meteorológica. <https://datosclima.es/Aemet2013/DescargaDatos.html>. Accessed 30 Oct 2017.
29. Otranto D, Brianti E, Cantacessi C, Lia RP, Máca J. The zoophilic fruitfly *Phortica variegata*: morphology, ecology and biological niche. *Med Vet Entomol*. 2006;20:358–64.
30. Skryabin KI, Sobolev AA, Ivashkin VM. Principles of Nematology, vol. IX. Spirurata of animals and man and the disease caused by them. Part. 4: Thelazioidea. In: Moscow: Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR; 1967. Jerusalem: English translation Published by Israel Program for Scientific Translations; 1971.
31. Otranto D, Stevens JR, Testini G, Cantacessi C, Máca J. Molecular characterization and phylogenesis of Steganinae (Diptera, Drosophilidae) inferred by the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1. *Med Vet Entomol*. 2008;22:37–47.
32. Otranto D, Testini G, De Luca F, Hu M, Shamsi S, Gasser RB. Analysis of genetic variability within *Thelazia callipaeda* (Nematoda: Thelazioidea) from Europe and Asia by sequencing and mutation scanning of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene. *Mol Cell Probes*. 2005;19:306–13.
33. Molecular Biology and NGS Analysis Tools. <http://www.geneious.com>. Accessed 5 Sep 2017.
34. The Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed 5 Sep 2017.
35. Colella V, Kirkova Z, Fok É, Mihalca AD, Tasić-Otašević S, Hodžić A, et al. Increase in eyeworm infections in eastern Europe. *Emerg Infect Dis*. 2016;22:1513–5.
36. Marino V, Montoya A, Checa R, Galvez R, Miró G. Situación de la thelaziosis en España: ¿qué ha pasado en los últimos 5 años? AVEPA Congress, 20–22 October, Granada, Spain; 2016.
37. Otranto D, Ferroglio E, Lia RP, Traversa D, Rossi L. Current status and epidemiological observation of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs, cats and foxes in Italy: a “coincidence” or a parasitic disease of the Old Continent? *Vet Parasitol*. 2003;116:315–25.
38. Dorchies P, Chaudieu G, Siméon LA, Cazalot G, Cantacessi C, Otranto D. First reports of autochthonous eyeworm infection by *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs and cat from France. *Vet Parasitol*. 2007;149:294–7.
39. Malacrida F, Hegglin D, Bacciarini L, Otranto D, Nägeli F, Nägeli C, et al. Emergence of canine ocular thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in southern Switzerland. *Vet Parasitol*. 2008;157:321–7.
40. Vieira L, Rodrigues FT, Costa Á, Diz-Lopes D, Machado J, Coutinho T, et al. First report of canine ocular thelaziosis by *Thelazia callipaeda* in Portugal. *Parasit Vectors*. 2012;5:124.
41. Soares C, Sousa SR, Anastácio S, Matias MG, Marquês I, Mascarenhas S, et al. Feline thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Portugal. *Vet Parasitol*. 2013;196:528–31.
42. Hodžić A, Latrofa M, Annoscia G, Alić A, Beck R, Lia R, et al. The spread of zoonotic *Thelazia callipaeda* in the Balkan area. *Parasit Vectors*. 2014;7:352.
43. Motta B, Nägeli F, Nägeli C, Solari-Basano F, Schiessl B, Deplazes P, et al. Epidemiology of the eye worm *Thelazia callipaeda* in cats from southern Switzerland. *Vet Parasitol*. 2014;203:287–93.
44. Mihalca A, D'Amico G, Scurtu I, Chirilă R, Matei I, Ioniță A. Further spreading of canine oriental eyeworm in Europe: first report of *Thelazia callipaeda* in Romania. *Parasit Vectors*. 2015;8:48.
45. Diakou A, Di Cesare A, Tzimoulia S, Tzimoulia I, Traversa D. *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae): first report in Greece and a case of canine infection. *Parasitol Res*. 2015;114:2771–5.
46. Otranto D, Stevens JR, Cantacessi C, Gasser RB. Parasite transmission by insects: a female affair? *Trends Parasitol*. 2008;24:116–20.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## **5.2. Temperature is a common climatic descriptor of lachryphagous activity period in *Phortica variegata* (Diptera: Drosophilidae) from multiple geographical locations**

En este artículo se desarrolló el siguiente objetivo específico de la presente Tesis Doctoral:

- i. Determinar las variables ambientales que influyen sobre la abundancia de *Phortica variegata* y su dinámica estacional.

A continuación, presentamos los resultados de un estudio multicéntrico que involucró cinco sitios en cuatro países (Italia, España, Reino Unido y EE. UU.) donde la thelaziosis canina es endémica y/o donde ya se había comprobado la presencia de *P. variegata*.

Los sitios de muestreo fueron:

Área de estudio 1. Highland Park (Rochester, Nueva York, EE. UU).

Área de estudio 2. New Forest (distrito de Hampshire, Inglaterra, Reino Unido).

Área de estudio 3. El Escorial (noroeste de la Comunidad de Madrid, España).

Área de estudio 4. Manziana (región de Lazio, Italia).

Área de estudio 5. Oliveto Lucano (región de Basilicata, Italia).

Los resultados de campo se obtuvieron quincenalmente desde mediados de abril hasta finales de noviembre de 2018 a través de muestreos entomológicos estandarizados (mismo diseño de muestreo y mismos tiempos de recolección en todos los sitios) realizando las capturas de moscas mediante la técnica de manguero alrededor de los ojos de un cebo humano.

Los resultados obtenidos se asociaron con las variables climáticas locales registradas en cada sitio de muestreo (temperatura, velocidad del viento, presión atmosférica, humedad relativa y horas de luz).

Se recolectaron un total de 4862 especímenes de *P. variegata* (4637 machos y 224 hembras), con grandes diferencias en densidades entre los diferentes sitios de muestreo. En particular, el mayor número de moscas se obtuvo en los sitios con latitudes inferiores, y en especial, en El Escorial (España), que es precisamente una de las áreas de estudio incluida en esta Tesis Doctoral.

Se demostró una correlación positiva significativa entre la densidad de machos de *P. variegata* y las variables meteorológicas temperatura y velocidad del viento, mientras que se observaron correlaciones negativas con la presión barométrica y la humedad relativa. Sin embargo, para la temperatura, estas diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los sitios de muestreo.

**Publicación científica:**

**Pombi, M., Marino, V., Jaenike, J., Graham-Brown, J., Bernardini, I., Lia, R.P., Beugnet, F., Miró, G., Otranto, D. (2020).** Temperature is a common climatic descriptor of lachryphagous activity period in *Phortica variegata* (Diptera: Drosophilidae) from multiple geographical locations. *Parasit. Vectors* 13, 89. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3955-0>

**Índice de impacto y posición de la revista en el área JCR (en su año de publicación):**

- Índice de impacto: 2,824
- Cuartil: Q1

Fuente: <https://www.recursoscientificos.fecyt.es/>



RESEARCH

Open Access



# Temperature is a common climatic descriptor of lachryphagous activity period in *Phortica variegata* (Diptera: Drosophilidae) from multiple geographical locations

Marco Pombi<sup>1\*</sup> , Valentina Marino<sup>2</sup>, John Jaenike<sup>3</sup>, John Graham-Brown<sup>4</sup>, Ilaria Bernardini<sup>1</sup>, Riccardo P. Lia<sup>5</sup>, Fred Beugnet<sup>6</sup>, Guadalupe Miro<sup>2</sup> and Domenico Otranto<sup>5</sup>

## Abstract

**Background:** The drosophilid *Phortica variegata* is known as vector of *Thelazia callipaeda*, the oriental eyeworm native to Asia that has become an emergent zoonotic agent in several European regions. Unlike almost all other arthropod vectors of pathogens, only *P. variegata* males feed of lachrymal secretions of animals, ingesting first-stage larvae (L1) of the worm living in the orbital cavities of the host, and allowing with the same behaviour the introduction of infective L3. Despite the increased detection of *T. callipaeda* in many European countries, information about the length of the lachryphagous activity period of *P. variegata* and a deep knowledge of the environmental and climatic variables involved are still limited.

**Methods:** We herein present the results of a multicentre study involving five sites from four different countries (Italy, Spain, UK and USA) where canine thelaziosis is endemic and/or where it has already been ascertained the presence of *P. variegata*. Field data have been obtained on a fortnightly basis from mid-April to the end of November 2018 from a contemporary standardized sampling (same sampling effort and time of collection in all sites) of lachryphagous flies collected around the eyes of a human bait using an entomological net. These data have been associated to data collection of local climatic variables (day length, temperature, wind speed, barometric pressure and relative humidity).

**Results:** Overall, a total of 4862 *P. variegata* flies (4637 males and 224 females) were collected, with high differences in densities among the different sampling sites. Significant positive correlations were found between *P. variegata* male density and temperature and wind speed, while negative correlations were observed for barometric pressure and relative humidity. However, the above significant differences are confirmed in each sampling site separately only for the temperature.

**Conclusions:** This multicentre study highlights that temperature is the major common environmental driver in describing the lachryphagous activity of *P. variegata* in Europe and USA and, therefore, the transmission risk of thelaziosis.

**Keywords:** Eyeworm, Lachryphagy, Vector ecology, Vector-borne disease, Zoonosis, Environmental parameters

\*Correspondence: marco.pombi@uniroma1.it

<sup>1</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Rome, Italy

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

*Phortica variegata* (Diptera: Drosophilidae), a zoophilic fruit fly of the subfamily Steganinae (Drosophilidae), has attracted the interest of the scientific community because of its capacity to vector *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae) eyeworms. Amongst vector-borne helminths, *T. callipaeda* is an emergent zoonotic agent of concern to the public health of several European regions. The adult nematodes live in the orbital cavities and associated host tissues of dogs, cats, foxes, wolves, rabbits and humans, causing ocular disease [1–3]. Unlike almost all other arthropod vectors of pathogens, only *P. variegata* males feed of lachrymal secretions of animals, ingesting first-stage larvae (L1) of the worm. According to data from experimental infestation [4, 5], in the vector the larval development through to infective L3 occurs within 14–21 days; larvae may also survive in overwintering flies (for up to 6 months) before being transmitted to a receptive host [4]. Although *T. callipaeda* has not been reported from the USA, *P. variegata* has been found also in this country, and it has been demonstrated that flies collected in the USA can successfully transmit the parasite [5]. At the time when vector identity and biology were elucidated, the infection was known only in remote poor settings in southern Italy [4, 6, 7]. Nevertheless, ecological niche models predicted that large areas of Europe (including the UK) are suitable for the presence of *P. variegata*, thus highlighting the potential risk of *T. callipaeda* spreading to other European countries [8, 9]. Indeed, whilst *T. callipaeda* had exclusively been reported from easternmost countries until two decades ago, it has now been described in both animals and humans from Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Croatia, France, Germany, Greece, Hungary, Italy, Portugal, Romania, Serbia, Slovakia, Spain, Switzerland and Turkey [9–12]. Thus, this parasite can be considered as an emergent vector-borne pathogen in Europe, and zoonotic infections have been diagnosed on several occasions. As an example, in Spain, the first autochthonous case of thelaziosis was reported in 2010 [13]; following further reported cases of canine thelaziosis in this country, certain geographical areas are now considered endemic for this infection [14, 15]. Despite the increased detection of *T. callipaeda* in many European countries, information about the length of the lachryphagous activity period of *P. variegata* and a deep knowledge of the environmental and climatic variables involved are still limited.

We herein present the results of a multicentre study involving five sites from four different countries (Italy, Spain, UK and USA) where canine thelaziosis is endemic and/or where it has already been ascertained

the presence of *P. variegata*. Data obtained from a contemporary standardized field sampling over the whole reproductive season of the vector, associated with data collection of local climatic variables, elucidated the common environmental drivers of the population dynamics of *P. variegata* in Europe and North America. These results are of major importance in describing the climatic features associated to the abundance of lachryphagous males of *P. variegata* and, when put in the context of climate change, the epidemiological consequences of the transmission of *T. callipaeda* to the vertebrate hosts, highlighting the importance of thelaziosis among the zoonosis of public health relevance that should not be neglected.

## Methods

A longitudinal sampling was performed on a fortnightly basis from the mid of April to the end of November 2018 in five areas of four different countries in which *P. variegata* presence was already recorded. Each sampling site is described below.

### Sampling sites

Highland Park (Rochester, NY, USA, 43°07'59"N, 7°36'43"W; altitude 240 m a.s.l.). This ~60 ha park was established in 1888 within a low-density urban area whose total population is 208,000. The park occurs on a glacial moraine with alfisol soil. The area occurs with the humid continental climate zone with substantial seasonal variation in temperature. The site within the park where flies were collected includes relatively steep-sided slopes and flatter areas between the slopes. *Quercus rubra* is the dominant tree species, with individuals up to 150 cm in diameter at breast height (dbh). Other trees at the site include *Juglans nigra*, *Prunus serotina*, *Acer saccharum*, *Gymnocladus dioicus*, *Betula papyrifera* and *Tilia americana*. There is little understorey except at the margins of the wooded areas, where the shrubs *Rubus allegheniensis* and *Cercis canadensis* occur. Animals at the site include *Odocoileus virginianus*, *Vulpes vulpes*, *Sciurus carolinensis*, *Tamias striatus* and *Marmota monax*.

New Forest (Hampshire district, England, UK, 50°50'32"N, 01°30'53"W; altitude 20 m a.s.l.), a 219 square miles national park located on the south coast of mainland England. The climate is typical of the UK generally, with a temperate seasonal pattern of cold to cool winters and mild to warm summers with moderate rainfall throughout the year. The park is composed of a mixture of deciduous forest, predominantly *Quercus rubra* with *Fagus sylvatica* and *Betula pendula*, pastures and healthlands grazed by horses, cattle and wild cervids (*Capreolus capreolus* and *Dama dama*). The park is also

home to a number of other sylvatic species common to British woodland habitats, including *Meles meles* and *Vulpes vulpes*. The trapping site used for this study was on a boundary between woodland and heath at a location where *P. variegata* has been documented on several occasions previously [9].

El Escorial (Sierra de Guadarrama, Madrid, Spain, 40°36'10"N, 04°07'22"W; altitude 946 m a.s.l.). "La Herreña" forest is an area of 499 ha located in the "Sierra de Guadarrama", at 2.5 km south of the urban center of the municipality of El Escorial (northwest Madrid Community). The climate and vegetation are typically Mediterranean. Thus, summers are hot and dry, and maximum rainfall is recorded in autumn and spring. The vegetation consists of a rich range of herbaceous and woody species such as *Quercus pyrenaica*, *Ilex aquifolium*, *Betula celtiberica*, *Crataegus monogyna* and *Pinus brutia*. Animals most represented are *Cervus elaphus*, *Sus scrofa*, *Capreolus capreolus*, *Dama dama*, *Meles meles*, mustelids, *Felis silvestris*, *Vulpes vulpes*, *Canis lupus* and *Lepus europaeus*.

Manziana (Lazio region, Italy, 42°07'09"N, 12°06'58"E; altitude 378 m a.s.l.). This region is a slightly hilly forested area of 545 ha of volcanic origin with poor Mediterranean climatic characteristics. The dominant tree species is *Quercus cerris*, which is mostly associated with *Quercus frainetto*. The dominant shrub species is *Mespilus germanica*, associated with *Carpinus betulus*, *Acer monspessulanum*, *Acer campestre*, *Ilex aquifolium*, *Fraxinus ornus*, *Sorbus torminalis*, *Ruscus aculeatus*, *Ulmus minor*, *Malus sylvestris*, *Crataegus monogyna*. The most abundant wild animal species are *Vulpes vulpes*, *Sciurus vulgaris*, *Martes foina*, *Sus scrofa*, *Hystrix cristata*, *Lepus europaeus*. The forest is surrounded by a suburbanized area (7700 inhabitants) and is also frequented by domestic species such as dogs, horses and cattle.

Oliveto Lucano (Basilicata region, Italy, 40°32'37"N, 16°09'18"E; altitude 900 m a.s.l.). The Park of Gallipoli Cognato covers an area of 27.027 ha within the borders of the towns of Accettura, Calciano and Oliveto Lucano in the province of Matera, and Castelmezzano and Pietrapertosa in the province of Potenza. In the all municipalities of the park live 4900 inhabitants. It is a mountain area of arenaceous rock, with peaks above 1000 m a.s.l. (e.g. mount Caperrino 1400 m a.s.l.). The presence of watercourses is conspicuous but in the form of seasonal torrents. In the forest the tree species are *Quercus cerris*, *Quercus petraea*, *Quercus pubescens* and *Quercus frainetto*. Moreover, *Carpinus betulus*, *Tilia cordata*, *Acer campestre*, *Acer monspessulanum*, *Sorbus domestica* and *Fraxinus angustifolia* are present. The shrub layer is mainly composed of *Rubus fruticosus*, *Erica arborea*, *Genista tinctoria*, *Prunus spinosa*, *Amelanchier ovalis*,

*Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra*, and *Ilex aquifolium*. Wild animal species present are: *Vulpes vulpes*, *Martes foina*, *Martes martes*, *Mustela nivalis*, *Erinaceus europaeus*, *Hystrix cristata*, *Lepus europaeus*, *Lepus corsicanus*, *Sus scrofa*, *Sciurus vulgaris*, *Canis lupus* and *Felis silvestris*. The forest is also frequented by domestic species such as dogs, cats, sheep, pigs and cattle.

#### Collection of lachryphagous flies

In each sampling area two sites 200–400 m far from each other were chosen, to take into account for the local variability in the fly distribution. The sampling effort was 30 min per site, which was carried out twice in each sampling day (11:00–12:00 h and 15:00–16:00 h). Lachryphagous flies were collected around the eyes of a human bait using an entomological net, brought to the laboratory, and morphologically identified under a stereomicroscope [16].

#### Analysis of *P. variegata* abundance

*Phortica variegata* abundance obtained in each site was corrected, taking into account the effective sampling time as well as the number of collectors and baits used in each sampling (due to the occasional participation of two collectors at the same time). The daily abundance of lachryphagous males and females was transformed as  $\log_{10}(x+1)$  of flies per person per hour in order to linearize the relationship with climatic variables. These values were then independently associated to the following climatic variables, collected daily from each site (Additional file 1: Table S1): day length (expressed as % light time in 24 h), temperature (mean, minimum, maximum, expressed as °C), relative humidity (expressed as %), barometric pressure (expressed as mbar), mean wind speed (expressed as m/s) in order to detect possible correlations. Relationships between fly densities and climatic variables were calculated by Kendall's tau-b rank correlations as a non-parametric measure adjusted for tied ranks using Statsdirect software version 3.2.8 [17].

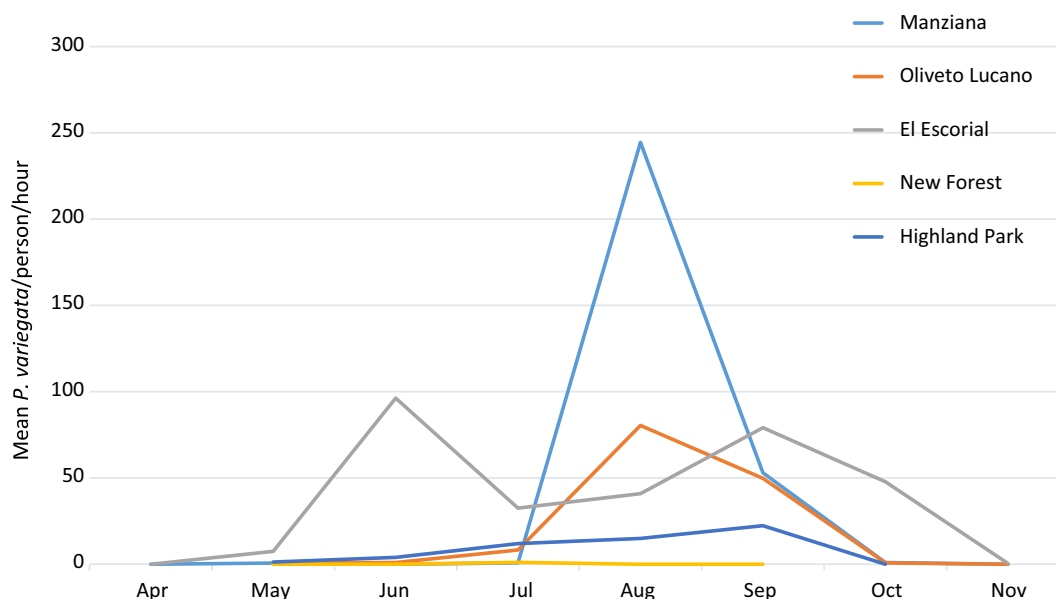
#### Results

Overall, a total of 4862 *P. variegata* flies (4637 males and 224 females) were collected, with high differences in densities among the different sampling sites (Table 1). In particular, the largest collection was obtained from the sites at the lowest latitude, El Escorial (Spain), with 2387 *P. variegata* flies, followed by Manziana (Italy,  $n = 1204$ ), Oliveto Lucano (Italy,  $n = 1127$ ), Highland Park (USA,  $n = 135$ ) and New Forest (England,  $n = 9$ ). Data on mean fly densities corrected for the sampling effort (expressed as number of flies per person per hour; Table 1, Fig. 1) showed a similar picture: El Escorial (141.3); Manziana (141.6); Oliveto Lucano (75.1); Highland Park (9.0); and

**Table 1** Collections of *Phortica variegata* flies over the sampling period (expressed as month and week of the calendar number) in all sites

Month	Week	Highland Park				New Forest				El Escorial				Manziana				Oliveto Lucano			
		Mean fly/p/h	Total catch	Mean male (%)	Mean fly/p/h	Total catch	Mean male (%)	Mean fly/p/h	Total catch	Mean male (%)	Mean fly/p/h	Total catch	Mean male (%)	Mean fly/p/h	Total catch	Mean male (%)	Mean fly/p/h	Total catch	Mean male (%)		
April	16																				
	17																				
May	18	0	0	0	0	0	0	16	16	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	19																				
	20	1.2	1	100	0	0	57	60	95	12	6	100	2	2	100	2	2	100	2	2	
	21																				
June	22	5	5	100	0	0	13	14	92.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	24	3	3	100	0	0	93	94	98.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
July	26	5	5	100	0	0	675	676	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	28	12	12	100	1.7	5	184	184	100	6	3	100	6	3	100	23	23	100	23	23	
August	30	11	12	91.7	2.5	4	75	76	98.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	32	20	20	100	0	0	66	68	97.1	636	318	100	636	318	100	101	101	100	101	101	
September	34	8	10	80	0	0	255	259	98.5	1320	660	100	1320	660	100	539	542	99.4	542	542	
	36	42	43	97.7	0	0	377	385	97.9	352	176	100	352	176	100	280	281	100	281	281	
October	38	22	23	95.7	0	0	84	74	93.2	72	36	100	72	36	100	117	117	100	117	117	
	39	1	1	100																	
November	40	0	0																		
	42	0	0																		
Total	43																				
	44	0	0																		
Total	46																				
	47																				
Total	48																				
		9	135	96.3	0.4	9	141.3	2387	91	141.6	1204	100	141.6	1204	100	75.1	1127	99.5	1127	1127	

Abbreviations: Mean fly/p/h, mean number of flies per person per hour; total catch, total number of flies collected in the day of sampling; male %, percentage of males individual on the total of catches



**Fig. 1** Population dynamics of *Phortica variegata* flies collected (expressed as mean numbers per person per hour) over the months of sampling in all sites

New Forest (0.4). Population dynamics of *P. variegata* in the different sites showed a unimodal curve with a common peak in density during weeks 34–36 (corresponding to the sampling dates 22nd August to 7th September 2018) in all sites but El Escorial. In the latter, a multimodal distribution has been observed, showing at least 4 peaks (weeks 20, 26, 36 and 40) with a maximum at week 26.

The male/female ratio obtained from the collection around the eyes of the human bait was heterogeneous (Table 1, Fig. 2), with sites in which only males were collected (Manziana and New Forest), and others in which some females were also trapped: El Escorial 9%; Highland Park 3.7%; and Oliveto Lucano 0.5%. This supposed lachryphagous activity of females seems to be present all over the sampling season, without a specific pattern. However, a strong increase in female collection (> 30%) was observed from October in El Escorial.

Pooling data from all sites of the four countries, *P. variegata* male densities, expressed as the logarithm of flies per person per hour, showed significant positive correlations with temperature (maximum, minimum and mean) and mean daily wind speed, while negative correlations were observed for barometric pressure and relative humidity. However, the above significant differences are confirmed in each sampling site separately only for the temperature parameters (Table 2), with the exception of New Forest, in which no significant correlations were found. The other correlations observed in the single sites excluding the temperature were a negative correlation

with wind speed in Manziana and with relative humidity in El Escorial.

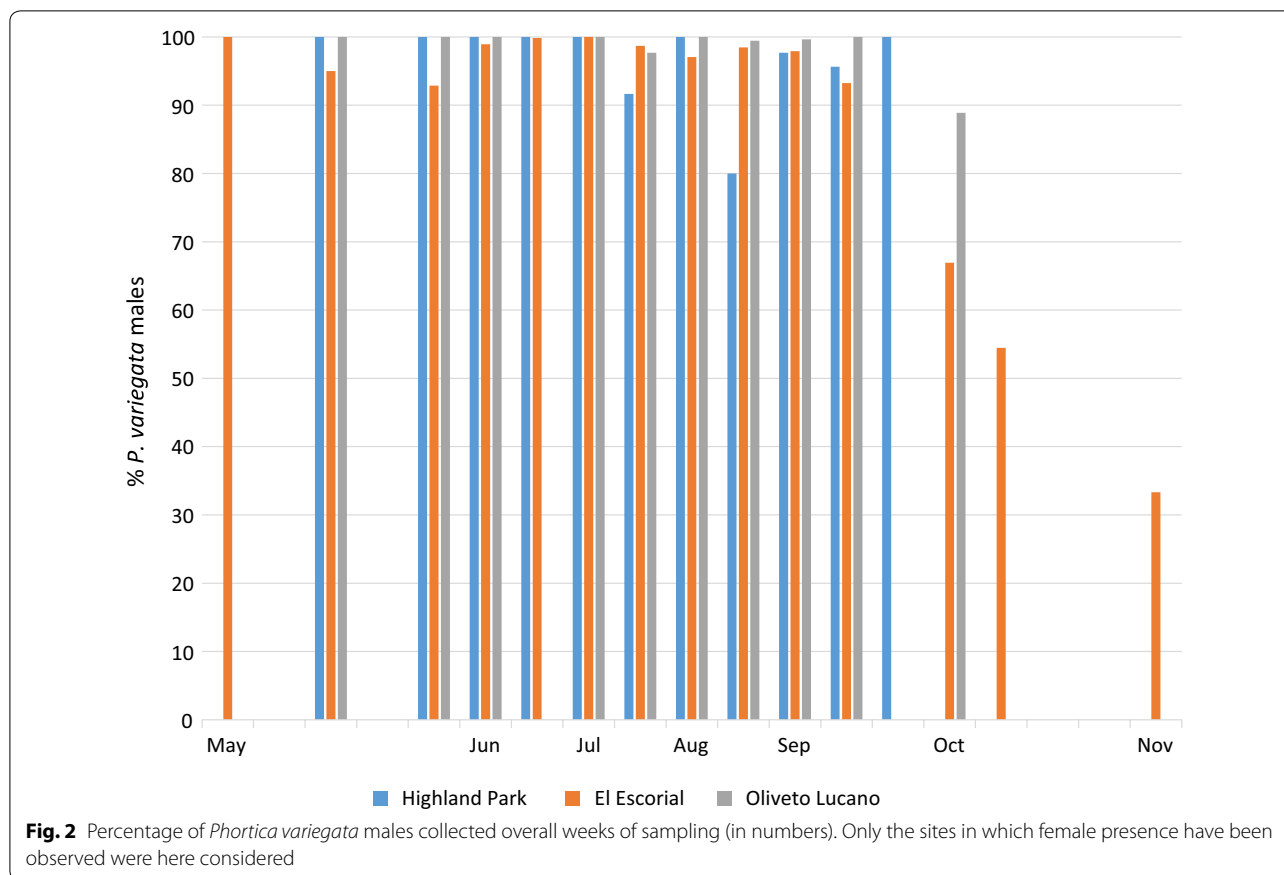
The temperature of activity of lachryphagous males (in which at least one fly was collected) varies in different sites, ranging from a daily minimum of 7 °C (Manziana) to a daily maximum of 35 °C (El Escorial), despite the temperature range during the sampling period in all sites varied from 0 °C to 36 °C (Table 3).

The correlation analysis of female densities of *P. variegata* (expressed as logarithm of flies per person per hour), cumulatively collected in the sites of Oliveto Lucano, El Escorial and Highland park, shows significant positive correlation with wind speed (Kendall's tau  $b=0.24$ ;  $P=0.043$ ) and negative correlations with pressure (Kendall's tau  $b=-0.38$ ;  $P=0.0008$ ) and relative humidity (Kendall's tau  $b=-0.29$ ;  $P=0.010$ ).

## Discussion

Our data indicate that temperature is an important driver of the seasonal dynamics of *P. variegata* lachryphagous males in the countries sampled, indicating that this climatic variable in particular is directly associated with the lachryphagous behaviour and therefore with the *T. calli-paeda* transmission risk.

Vector-borne diseases follow complex epidemiological patterns due to the interaction of the pathogen, the vector and the vertebrate host/s species [18, 19]. In the case of thelaziosis, the records of infected dogs, as well as other hosts including humans, are increasing in the past decade in several European countries, indicating that *T.*



*callipaeda* is spreading continent-wide. This is probably due to the diffusion of the vector *P. variegata* or, more likely, to the movements of infected dogs in areas where the vector is present. The latter hypothesis is the most likely considering the nearly ubiquitous distribution of *Phortica* spp. flies [16]. The knowledge of the ecological niche of *P. variegata* is of major importance to understand if and how eyeworm infection can spread locally in different contexts, and what are the environmental drivers potentially favouring the establishment of the vector at a continental scale. A habitat suitability map of this species has been established, indicating a large potential of diffusion in Europe [8, 9]. However, data at the origin of the development of the model are fragmentary and, more importantly, no information is available concerning environmental parameters affecting the population dynamics of *P. variegata*, except those obtained from a few sites [8, 14]. The multicentre approach herein presented allows identification of the climatic parameters that correlate with the population dynamics of *P. variegata* across the reproductive season.

Among the five sites of the four countries sampled, *P. variegata* has shown to be mostly present in Spain and South Italy (Table 1), as already described for the sites El

Escorial [14] and Oliveto Lucano [7, 20], as well as in a site of Central Italy where *P. variegata* has been described here for the first time (i.e. Manziana). The latter is a forest in which Turkey oak tree (*Quercus cerris*) is highly abundant, confirming the strong ecological associations between *P. variegata* and this species [8, 9]. At higher latitudes (New Forest, UK) and in the only site out of Europe (Highland Park, USA), *P. variegata* showed a narrow period of activity (Fig. 1), which might be explained by the less permissive climatic conditions observed in these sites compared to the localities in Spain and Italy (Additional file 1: Table S1). At this site in North America, the dominant tree species is the northern red oak (*Quercus rubra*), suggesting that association between oaks and the distribution of *P. variegata* may be quite general.

The present results show a direct correlation among temperature measures in the whole dataset, as well as analysing the different sites separately (Table 2), indicating that this parameter is important in the lachryphagous activity of *P. variegata* males. On the contrary, the direct correlation with mean wind speed, as well as the inverse correlation with barometric pressure and relative humidity, showed significant values only including data from all sites. But, when analysed per site, they seem to have a

**Table 2** Kendall’s rank correlation of climatic variables versus *Phortica variegata* males referred to the day of sampling

Site	Variable	Valid n	Kendall’s tau b	P-value
All sites	Day length	76	0.021	0.80
	<i>Maximum temperature</i>	75	0.45	<0.0001
	<i>Minimum temperature</i>	75	0.40	<0.0001
	<i>Mean temperature</i>	75	0.43	<0.0001
	<i>Mean wind speed</i>	73	0.17	0.044
	<i>Barometric pressure</i>	76	−0.25	0.003
	<i>Relative humidity</i> <sup>a</sup>	55	−0.23	0.014
	Manziana	Day length	17	−0.16
Maximum temperature		16	0.30	0.15
<i>Minimum temperature</i>		16	0.15	0.025
Mean temperature		16	0.34	0.10
<i>Mean wind speed</i>		17	−0.40	0.039
Barometric pressure		17	0.13	0.53
Relative humidity		7	0.59	0.10
Oliveto Lucano		Day length	17	0.27
	<i>Maximum temperature</i>	17	0.58	0.002
	<i>Minimum temperature</i>	17	0.39	0.041
	<i>Mean temperature</i>	17	0.47	0.015
	<i>Mean wind speed</i>	17	−0.15	0.44
	Barometric pressure	17	−0.08	0.70
	Relative humidity	17	−0.07	0.74
	El Escorial	Day length	17	0.30
<i>Maximum temperature</i>		17	0.57	0.002
<i>Minimum temperature</i>		17	0.48	0.008
<i>Mean temperature</i>		17	0.59	0.001
<i>Mean wind speed</i>		14	−0.16	0.47
Barometric pressure		17	0.35	0.057
<i>Relative humidity</i>		16	−0.39	0.042
New Forest		Day length	10	0.18
	Maximum temperature	10	0.55	0.07
	Minimum temperature	10	0.22	0.51
	Mean temperature	10	0.44	0.15
	<i>Mean wind speed</i>	10	−0.11	0.80
	Barometric pressure	10	−0.11	0.80
	Relative humidity	na	na	na

different relationship according to the geographical context. In fact, wind and relative humidity are negatively correlated with the lachryphagous dynamics of *P. variegata* males only in Manziana and El Escorial, respectively, indicating that their effect is probably linked to local

**Table 2 (continued)**

Site	Variable	Valid n	Kendall’s tau b	P-value
Highland Park	Day length	15	0.24	0.25
	<i>Maximum temperature</i>	15	0.56	0.006
	<i>Minimum temperature</i>	15	0.76	0.0002
	<i>Mean temperature</i>	15	0.52	0.010
	Mean wind speed	15	0.06	0.80
	Barometric pressure	15	−0.18	0.39
	Relative humidity	15	0.08	0.73

<sup>a</sup> New Forest data not available

Notes: Day length recorded as % of light in 24 hours; temperature recorded as °C; wind speed recorded as m/s; pressure recorded as hPa; humidity recorded as %. *Italic highlights the variables with significant correlations (P-value < 0.05)*

Abbreviations: Valid n, records used in the statistics; Kendall’s tau b, correlation value; P-value, two-sided significance level of the b-statistics; na, data not available

**Table 3** Temperature (°C) ranges (minimum–maximum) for which at least one male individual of *Phortica variegata* was collected and the temperature range measured over the sampling period in each site of the study

Site	Min. T (°C)	Max T (°C)	Temperature range (°C)
Highland Park	9	34	0–34
New Forest	11	29	1–29
El Escorial	8	35	3–35
Manziana	7	34	5–36
Oliveto Lucano	9	32	9–32

situations and it should not be excluded that they are spurious correlations.

The few *P. variegata* females captured around human eyes in three sites out of five (i.e. Oliveto Lucano, El Escorial and Highland Park) showed correlations with day length, relative humidity and barometric pressure but not with temperature. However, even if we take this observation as anecdotal and of negligible epidemiological relevance (considering the low numbers of females collected in this study), it seems that the environmental drivers associated with females are different from those linked to males.

**Conclusions**

The heterogeneity of statistical associations of climatic parameters and the different sampling points taken into account in this multicentre study indicates how complex is the population dynamics of *P. variegata* concerning

its geographical distribution. Temperature is a common descriptor of *P. variegata* male lachryphagy in almost all sites (with exception of the northern area, i.e. New Forest, UK, in which however the small dataset did not allow to obtain reliable results) both at its extreme values (minimum and maximum). By sampling across a wide range of temperatures, ranging from 0 °C to 36 °C (Table 3), we were able to ascertain that the minimum temperature in which lachryphagous activity occurred ranged from 7 °C to 11 °C, regardless the latitude. If we put these results in the frame of the global climate changing scenario, we can suppose that the future increase in temperatures predicted from IPCC [21] will subsequently modify (possibly increasing) the period of activity of *P. variegata* as well as its distribution and density northwards Europe [9] and, possibly, North America. The epidemiological consequences of these results reside in the direct relationship between lachryphagous activity of *P. variegata* males and the transmission of *T. callipaeda* to the vertebrate hosts, increasing the relevance of thelaziosis in the public health that should not be neglected.

## Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3955-0>.

**Additional file 1: Table S1.** Monthly values of the climatic variables measured in this study per each sampled site during the period of activity of *Phortica variegata*.

## Abbreviations

a.s.l.: above sea level; dbh: diameter at breast height.

## Acknowledgements

Sample collection at the New Forest site, UK, was gratefully assisted by Jennifer Palfreyman, University of Liverpool, and conducted in collaboration with the medical entomology group, Public Health England.

## Authors' contributions

MP and DO conceived the study. MP, VM, GM and DO organized the sampling plan. MP, VM, JJ, JGB, IB and RPL collected data in the field and identified the specimens. MP analysed the results. MP and DO drafted the manuscript and all authors critically contributed to its final version. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

The sampling activity in Manziana (Rome) was supported by ClinGlobal & Boehringer-Ingelheim.

## Availability of data and materials

The datasets used and analysed during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Author details

<sup>1</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma, Rome, Italy. <sup>2</sup> Animal Health Department, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. <sup>3</sup> University of Rochester, Rochester, NY, USA. <sup>4</sup> Department of Livestock Health and Welfare, Institute of Veterinary Science, University of Liverpool, Liverpool, UK. <sup>5</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari, Italy. <sup>6</sup> Boehringer Ingelheim Animal Health, Lyon, France.

Received: 4 November 2019 Accepted: 10 February 2020

Published online: 18 February 2020

## References

- Shen J, Gasser RB, Chu D, Wang Z, Yuan X, Cantacessi C, et al. Human thelaziosis—a neglected parasitic disease of the eye. *J Parasitol*. 2006;92:872–5.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Brianti E, Traversa D, Petrić D, Genchi C, et al. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites Vectors*. 2013;6:16.
- Malacrida F, Hegglin D, Bacciarini L, Otranto D, Nägeli F, Nägeli C, et al. Emergence of canine ocular thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in southern Switzerland. *Vet Parasitol*. 2008;157:321–7.
- Otranto D, Cantacessi C, Testini G, Lia RP. *Phortica variegata* as an intermediate host of *Thelazia callipaeda* under natural conditions: evidence for pathogen transmission by a male arthropod vector. *Int J Parasitol*. 2006;36:1167–73.
- Otranto D, Iatta R, Lia RP, Cavalera MA, Máca J, Pombi M, et al. Competence of *Phortica variegata* from the United States as an intermediate host of the *Thelazia callipaeda* eyeworm. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98:1175–8.
- Otranto D, Ferroglio E, Lia RP, Traversa D, Rossi L. Current status and epidemiological observation of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs, cats and foxes in Italy: a "coincidence" or a parasitic disease of the Old Continent? *Vet Parasitol*. 2003;116:315–25.
- Otranto D, Lia RP, Buono V, Traversa D, Giangaspero A. Biology of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) eyeworms in naturally infected definitive hosts. *Parasitology*. 2004;129:627–33.
- Otranto D, Brianti E, Cantacessi C, Lia RP, Máca J. The zoophilic fruitfly *Phortica variegata*: morphology, ecology and biological niche. *Med Vet Entomol*. 2006;20:358–64.
- Palfreyman J, Graham-Brown J, Caminade C, Gilmore P, Otranto D, Williams DJL. Predicting the distribution of *Phortica variegata* and potential for *Thelazia callipaeda* transmission in Europe and the United Kingdom. *Parasites Vectors*. 2018;11:272.
- Timmins DR, Staunton KM, Meyer DB, Townsend M, Paton CJ, Ramírez AL, et al. Modifying the biogents sentinel trap to increase the longevity of captured *Aedes aegypti*. *J Med Entomol*. 2018;55:1638–41.
- Ionică AM, Deak G, D'Amico G, Stan GF, Chişamera GB, Constantinescu IC, et al. *Thelazia callipaeda* in mustelids from Romania with the European badger, *Meles meles*, as a new host for this parasite. *Parasites Vectors*. 2019;12:370.
- Hodžić A, Payer A, Duscher GG. The first autochthonous case of feline ocular thelaziosis in Austria. *Parasitol Res*. 2019;118:1321–4.
- Miró G, Montoya A, Hernández L, Dado D, Vázquez M, Benito M, et al. *Thelazia callipaeda*: infection in dogs: a new parasite for Spain. *Parasites Vectors*. 2011;4:148.
- Marino V, Gálvez R, Colella V, Sarquis J, Checa R, Montoya A, et al. Detection of *Thelazia callipaeda* in *Phortica variegata* and spread of canine thelaziosis to new areas in Spain. *Parasites Vectors*. 2018;11:195.
- Fuentes I, Montes I, Saugar JM, Latrofa S, Gárate T, Otranto D. Thelaziosis in humans, a zoonotic infection, Spain, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:2073–5.

16. Bachli G, Vilela C, Escher SA, Saura A. The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, Vol. 39. Leiden: Brill; 2005.
17. StatsDirect Ltd. StatsDirect statistical software. Cheshire: StatsDirect Ltd; 2013.
18. Otranto D. Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: from pathways and times of transmission to disease control. *Vet Parasitol*. 2018;251:68–77.
19. Matthews KR. Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites. *Science*. 2011;331:1149–53.
20. Otranto D, Dantas-Torres F, Mallia E, DiGeronimo PM, Brianti E, Testini G, et al. *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in wild animals: report of new host species and ecological implications. *Vet Parasitol*. 2009;166:262–7.
21. Masson-Delmotte V, Zhai P, Pörtner HO, Roberts D, Skea J, Shukla PR, et al. Global warming of 1.5 °C. An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5 °C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change. 2018. <https://www.ipcc.ch/sr15/>. Accessed 6 Feb 2020.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





### 5.3. Spain as a dispersion model for *Thelazia callipaeda* eyeworm in dogs in Europe

En este artículo se desarrollaron los siguientes objetivos específicos relacionados con el hospedador canino:

- i. Determinar la prevalencia actual de la thelaziosis canina en áreas endémicas de España.
- ii. Determinar los factores de riesgo que influyen sobre la infección por *Thelazia callipaeda* en el perro.
- iii. Diseñar una clasificación clínica de los pacientes con thelaziosis canina.
- iv. Desarrollar mapas actualizados de la distribución geográfica de casos de thelaziosis canina en España desde su primera denuncia hasta la actualidad.

Hoy sabemos que la dispersión de la thelaziosis ocular es un fenómeno epidemiológico de grandes dimensiones ya que en tan solo una década se ha multiplicado el número de casos de forma exponencial, ampliándose de manera constante su dispersión (do Vale *et al.*, 2019; 2020).

Cuando empezamos los trabajos incluidos en esta memoria, no poseíamos muchos de los conocimientos actuales sobre esta parasitosis y, en consecuencia, decidimos estudiar la evolución de la thelaziosis en España desde su aparición.

Cabe señalar que el primer objetivo (i) también se desarrolló en la publicación 5.1.

Se realizaron dos estudios en paralelo: a) Primer estudio, compendio sobre casos clínicos detectados en clínicas veterinarias que forman parte de una red centinela y b) Segundo estudio, estudios de prevalencia de la infección por *T. callipaeda* en el perro en zonas endémicas.

a) Primer estudio: Detección de casos clínicos.

Se recopilaron 510 casos de thelaziosis canina, detectados en el periodo comprendido entre mayo de 2010 y diciembre de 2018, en 73 clínicas veterinarias en España y una en Andorra.

b) Segundo estudio: Estudio sobre la prevalencia de la infección por *T. callipaeda* en el perro en zonas endémicas.

En los dos sitios de muestreo seleccionados se habían notificado previamente casos de thelaziosis en perros y gatos:

Área de estudio 1. La Vera (Cáceres) y municipio de Candeleda (Ávila). Se examinó una población de 137 perros de caza durante los años 2017 y 2018. Estos perros se clasificaron como "perros de alto riesgo".

Área de estudio 2. El Escorial (noroeste de la Comunidad de Madrid). Se examinaron 97 perros de compañía entre los años 2016 y el 2018. Estos perros se clasificaron como "perros de bajo riesgo".

Las prevalencias de la infección por *T. callipaeda* registradas en los sitios de muestreo fueron de 84/137 (61,3%) en el Sitio 1 y 29/97 (29,9%) en el Sitio 2.

La infección por *T. callipaeda* se correlacionó con las variables epidemiológicas tamaño y peso de los perros enfermos, resultando estadísticamente significativas. Asimismo, la falta de medidas preventivas específicas resultó ser un factor de riesgo de padecer la infección por *T. callipaeda* en el Sitio 1.

Además, en este estudio se diseñó clasificación clínica de los principales signos oculares que pueden afectar a los perros con infección por *T. callipaeda*. En ella se definieron cuatro estadios clínicos de la enfermedad (**Fig. 1** de la publicación 5.3.), registrándose una correlación entre la gravedad de la infección y el número de parásitos presentes en el ojo.

Con el análisis de los resultados obtenidos en los dos estudios, se recopilaron un total de 1114 casos de infección por *T. callipaeda* localizados en 121 municipios de España y 6 municipios de Andorra. En 86 de los 121 municipios de España y en todos los municipios andorranos los casos detectados fueron autóctonos.

Utilizando esta información se localizaron los centroides de las áreas geográficas donde se habían registrado casos de thelaziosis canina, y se le asignaron valores de las capas de la altitud y el piso bioclimático. El número de casos de *T. callipaeda* en cada sitio fue representado en el mapa como un círculo de un tamaño creciente según el número de casos. Así se generaron tres mapas acumulativos de casos positivos para los años 2010, 2014 y 2018. Atendiendo a la distribución geográfica de los casos, 77 de 92 (83,7%) municipios con casos autóctonos se localizaron en los pisos bioclimáticos supramediterráneo (48,9%) o mesomediterráneo (34,8%), a altitudes medias de 960,72 y 560,04 m s.n.m., respectivamente (**Fig. 3** de la publicación 5.3.).

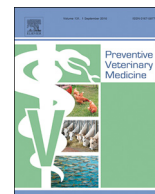
**Publicación científica:**

**Marino, V., Gálvez, R., Montoya, A., Mascuñán, C., Hernández, M., Barrera, J.P., Domínguez, I., Zenker, C., Checa, R., Sarquis, J., Miró, G. (2020b).** Spain as a dispersion model for *Thelazia callipaeda* eyeworm in dogs in Europe. *Prev. Vet. Med.* 175, 104883. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104883>

**Índice de impacto y posición de la revista en el área JCR (en su año de publicación):**

- Índice de impacto: 2,304
- Cuartil: Q1

Fuente: <https://www.rekursoscientificos.fecyt.es/>



## Spain as a dispersion model for *Thelazia callipaeda* eyeworm in dogs in Europe



Valentina Marino<sup>a</sup>, Rosa Gálvez<sup>a,\*</sup>, Ana Montoya<sup>a</sup>, Carmen Mascuñán<sup>b</sup>, Mauro Hernández<sup>c</sup>, Juan Pedro Barrera<sup>a</sup>, Inés Domínguez<sup>d</sup>, Carla Zenker<sup>d</sup>, Rocío Checa<sup>a</sup>, Juliana Sarquis<sup>a</sup>, Guadalupe Miró<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Animal Health Department, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> La Cruz Verde Veterinary Clinic, Miraflores de la Sierra, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Ocuvet Veterinary Clinic, Torreldones, Madrid, Spain

<sup>d</sup> La Plaza Veterinary Clinic, El Escorial, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Dogs  
Emerging disease  
Epidemiology  
Prevalence  
Spain  
Spread  
*Thelazia callipaeda*

### ABSTRACT

*Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) causes ocular infection in carnivorous animals and humans. While growing numbers of companion dogs and sometimes cats are being diagnosed with thelaziosis, little is known about its real spread. As it has been also diagnosed in wild animals and human beings, it is considered a potential emerging zoonotic disease.

This study provides information about the spread of the parasite in dogs in Spain since its initial description in 2010 until 2018. The first detection of *T. callipaeda* in the Principality of Andorra in 2017 is also reported. Two different studies were conducted: a) a survey in which clinical cases from veterinary practices were collected and b) a prevalence study in two endemic areas in western and central Spain (Site 1 La Vera region, Cáceres, and Site 2 El Escorial municipality, Madrid). In total, 1114 cases of thelaziosis were detected in 121 municipalities of Spain and 6 municipalities of Andorra. In 92 out of these 127 municipalities, reports were of autochthonous cases. Six hundred twenty-three out of 1114 presented data collection sheet and were included in the statistical analysis: 510 cases identified by veterinarians in Spain and Andorra in Study 1, and 113 cases detected among the 234 dogs (48.3 %) examined in the prevalence study (Study 2). Prevalences were 61.3 % (84/137) for Cáceres and 29.9 % (29/97) for Madrid, being Site 1 significantly more risky ( $P < 0.0001$ , odds ratio: 3.72, CI: 2.14–4.47 %) compared to Site 2.

Our study updates data for canine thelaziosis reported in the last decade in Spain and Andorra. Results highlight the urgent need for prevention strategies to control the spread of this potential zoonotic disease.

### 1. Introduction

*Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) is a parasitic nematode and the most common cause of eyeworm infection in dogs, cats, humans, and several wild mammalian species. Adult *T. callipaeda* worms reside under the eyelid of their definitive host causing subclinical infection or ocular signs such as epiphora, photophobia, conjunctivitis, keratitis, and ulcers (Anderson, 2000; Otranto and Traversa, 2005). In Europe, the vector and intermediate host of this nematode is the male drosophilid fly *Phortica variegata* (Drosophilidae, Steganinae), which displays zoophilic behaviour when it feeds on the host's lachrymal secretions (Otranto et al., 2006b).

Until 1989, *T. callipaeda* had been described only in Asian countries,

and hence its name of Oriental eyeworm (Bhaibulaya et al., 1970; Shi et al., 1988; Anderson, 2000; Shen et al., 2006). Since its first description in Italy in 1989 (Rossi and Bertaglia, 1989; Otranto et al., 2003a), this parasite has been increasingly reported in dogs and cats in many other European countries in the following chronological order: Germany in 2004 (Hermosilla et al., 2004; Magnis et al., 2009), France in 2007 (Dorchies et al., 2007; Ruytoor et al., 2010), Switzerland in 2008 (Malacrida et al., 2008; Motta et al., 2014), Spain in 2011 (Miró et al., 2011), Portugal in 2012 (Rodrigues et al., 2012; Vieira et al., 2012; Pimenta et al., 2013; Soares et al., 2013; Maia et al., 2016), Belgium in 2013 (Caron et al., 2013), Bosnia and Herzegovina, Croatia (Hodžić et al., 2014) and Serbia in 2014 (Gajić et al., 2014; Hadži-Milić et al., 2016; Tasić-Otašević et al., 2016), Romania (Mihalca et al., 2015;

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [r.galvez@ucm.es](mailto:r.galvez@ucm.es) (R. Gálvez), [gmiro@ucm.es](mailto:gmiro@ucm.es) (G. Miró).

Ioniță et al., 2016; Tudor et al., 2016; Dumitrache et al., 2018) and Greece in 2015 (Diakou, 2017; Papadopoulos et al., 2017), Hungary, Bulgaria (Colella et al., 2016; Farkas et al., 2018), Austria (Hinney et al., 2016; Hodžić et al., 2019) and United Kingdom in 2016 (Graham-Brown et al., 2016, 2017; Hammond, 2018), Slovakia in 2017 (Čabanová et al., 2017), Turkey in 2018 (Eser et al., 2018) and Czech Republic in 2019 (Hofmannová et al., 2019).

In wild mammals, *T. callipaeda* infection was described for the first time in Italy by Otranto et al. (2003a). To date, ocular thelaziosis has been detected in red foxes (*Vulpes vulpes*), gray wolves (*Canis lupus*), beech martens (*Martes foina*), brown hares (*Lepus europaeus*), wild cats (*Felis silvestris*) (Otranto et al., 2009), wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) (Gama et al., 2016; Papadopoulos et al., 2017) and golden jackals (*Canis aureus*) (Mihalca et al., 2016).

Human cases of thelaziosis have been mainly documented in people living in East Asian countries (e.g., Japan, Korea, China, India) (reviewed by Colwell et al., 2011) though reports of human eye infection have also emerged from Italy, France (Otranto and Dutto, 2008), Spain (Fuentes et al., 2012; Gomez-Couso et al., 2013; López Medrano et al., 2015), Serbia (Tasić-Otašević et al., 2016) and Croatia (Paradžik et al., 2016). Today, the spread and increasing reports of the eyeworm especially in animals but also in humans, means it is classed as an emergent vector-borne pathogen in Europe (Otranto et al., 2013).

In Spain, *T. callipaeda* has been diagnosed in domestic dogs (Miró et al., 2011; Marino et al., 2018a), domestic cats (Montoya et al., 2011b; Hernandez et al., 2012a; Marino et al., 2015), red foxes (*Vulpes vulpes*) (Calero-Bernal et al., 2013; Fidalgo et al., 2017) and humans (Fuentes et al., 2012; Gomez-Couso et al., 2013; López Medrano et al., 2015). The first autochthonous case of ocular thelaziosis was described in 2010 in a dog that had spent a few weeks in the region of La Vera (Cáceres Province, western Spain) (Guisado and Sanz, 2010). Since initial reports of this infection in dogs, numbers have been increasing dramatically in many regions of mainland Spain, especially in western regions (La Vera region and Salamanca province) (Dacal et al., 2011; Miró et al., 2011; Montoya et al., 2011a). Today, La Vera is considered highly endemic for canine thelaziosis with a prevalence of 68 % (Marino et al., 2018a). A second autochthonous focus of infection was described in the Orense province (Bello et al., 2012), adjacent to the North Portuguese border, where dogs have been found infected with *T. callipaeda* (Vieira et al., 2012; Pimenta et al., 2013). In addition, in two sites in Madrid (El Escorial and Miraflores de la Sierra) high infection prevalences of 26.1 % and 33.1 % respectively have been recently detected (Marino et al., 2018a). Clinical cases in cats recorded in endemic areas for dogs are sporadic (69 cases reported by our research group up to now) and usually linked to outdoor cats not subjected to adequate preventive measures against *Thelazia* infection (unpublished data). However, the true epidemiological role of cats remains unknown.

In the present study, we assess the geographical spread of *T. callipaeda* infection in dogs from 2010 to 2018 in Spain and report new autochthonous cases in the Principality of Andorra.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Data collection

Two separate studies were conducted in parallel: Study 1, a survey of a sentinel network of veterinary practices and Study 2, a prevalence study based on cross-sectional sampling of endemic areas.

Dogs participating in both studies were examined after the administration of anaesthetic eye drops (tetracaine hydrochloride and naphazoline hydrochloride). *T. callipaeda* eyeworms were extracted and collected from the conjunctival sac of infected dogs using sterile cotton swabs or by flushing with physiological saline solution. Nematodes, whenever possible, were morphologically identified at our laboratory using morphological keys available in literature (Otranto et al., 2003ab).

A data collection sheet was completed by the authors or participating veterinarians for each dog. Data recorded were: date, geographic location where the dog lives, lifestyle, breed, size, gender, age, presence of *T. callipaeda* infection, ocular signs, use of registered preventive measures against *T. callipaeda* infection (for instance milbemicin or moxidectin) and travel history.

#### 2.1.1. Study 1: Survey of clinical cases

Since the first reports of canine thelaziosis in Spain, our laboratory has served as a reference center. Veterinarians were asked to participate in the study by e-mail or by telephone. Also, there were included cases in which the veterinarians contacted to us themselves, to require information about treatment and/or prevention. Data were collected from veterinary clinics across Spain (n = 73) and Andorra (n = 1) participated in this study by filling in the form described above in which any case of canine *T. callipaeda* infection detected from May 2010 until December 2018 was reported.

#### 2.1.2. Study 2: Prevalence study in endemic areas

Dogs were recruited from two endemic areas of Spain where cases of thelaziosis in dogs and cats have been previously reported. A description of both sites has been published elsewhere (Marino et al., 2018a). To select the dogs, an active search was conducted at each sampling site and owners were selected to participate in the study.

The sampling sites were:

Site 1. La Vera region (northern Cáceres Province, 40°9'41"N, 5°23'13"W) and Candeleda municipality (Avila province, 40°9'11", 5°14'29"W) in central-western Spain; altitude 472 m and 424 m respectively above sea level (masl). A population of 137 owner hunting dogs living outdoors in two different farms was examined in situ over the period 2017 and 2018. These dogs were classified as "high-risk owned dogs".

Site 2. El Escorial municipality (northwest Madrid Community) in the Sierra de Guadarrama (40°36'10"N, 4°7'22"W); altitude 946 masl. 97 companion dogs were examined in situ from 2016 to 2018. These dogs were classified as "low-risk owned dogs".

### 2.2. Clinical staging

In both studies, each dog was clinically assessed for *T. callipaeda* infection using a grading system designed by one of the authors (MH), a veterinary ophthalmologist. In dogs in which *T. callipaeda* was detected, infection was classified as: Stage 1 (no clinical signs), Stage 2 (mild conjunctivitis to chronic follicular conjunctivitis), Stage 3 (complicated follicular conjunctivitis with marked hyperplasia of the third eyelid lymphoid tissue, chemosis and/or purulent ocular discharge), or Stage 4 (chronic follicular conjunctivitis with corneal ulcer) (Fig. 1).

### 2.3. Ethics statement

This study was carried out in accordance with international guidelines for the Care and Use of Experimental Animals and Spanish Legislation (RD 53/2013). The owner's approval was obtained for all medical procedures conducted. To ensure animal well-being, all dogs positive for *T. callipaeda* were treated with molecules that have efficacy registered for this parasite (for instance milbemicin or moxidectin).

### 2.4. Dispersion model for *T. callipaeda* in Spain

As far as we are aware, to date there have been 1142 cases reported of *Thelazia* in Spain. Of these, 1114 (97.5 %) are reported here by our research group, although some of these cases have been described in our prior work (Montoya et al., 2011a; Miró et al., 2011; Bello et al., 2012; Marino et al., 2015, 2016). As revealed by a literature search, the cases reported by other authors have been: 1 case in 2010 (Guisado and Sanz, 2010), 2 cases in 2011 (Dacal et al., 2011; Loscertales and Bonilla,



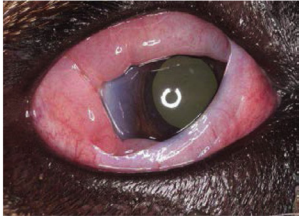
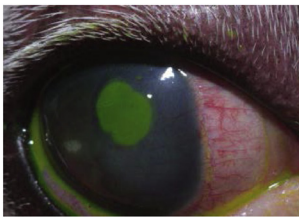
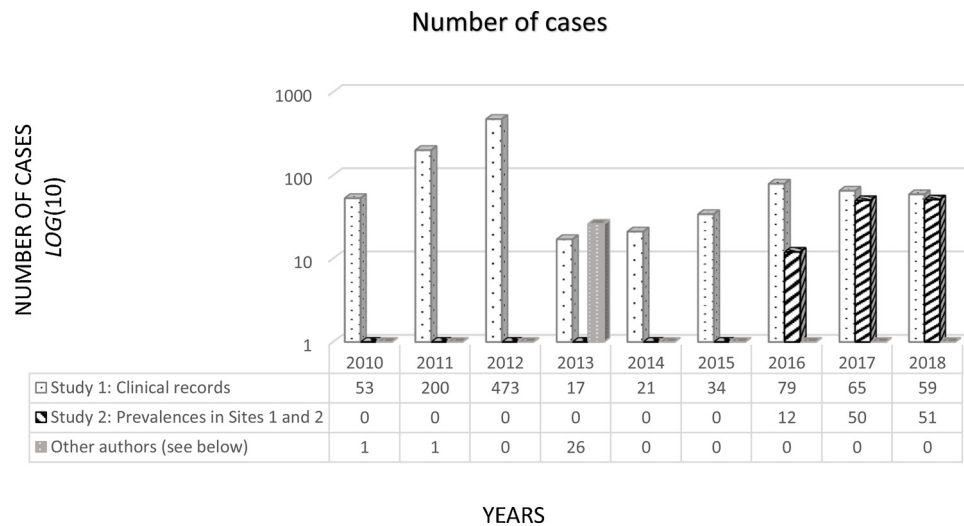
Clinical stage	Description	Ocular signs
Stage 1 (n= 203)	No ocular signs	
Stage 2 (n= 299)	Mild conjunctivitis to chronic follicular conjunctivitis	
Stage 3 (n= 32)	Complicated follicular conjunctivitis with marked hyperplasia of the third eyelid lymphoid tissue, chemosis and/or purulent ocular discharge	
Stage 4 (n= 13)	Chronic follicular conjunctivitis associated with corneal ulcer	

Fig. 1. Clinical staging of thelaziosis in dogs from Study 1.

2014) and 26 cases in 2013 (Arias et al., 2013; González Jiménez et al., 2013; Sánchez-Murillo et al., 2013) (Fig. 2). Using the information obtained here and in these literature reports, in the present paper we map the geographic locations and cases of canine thelaziosis trend in Spain for 2010, 2014 and 2018 (Fig. 3). The number of positive cases of *T. callipaeda* at each site (both studies) was geocoded and represented as a circle of a size reflecting the number of cases at that given site. Three cumulative maps of positive cases for the years 2010, 2014 and 2018 were generated using ArcGis Pro v.2.3.3 [Environmental Systems Research Institute (ESRI), Redlands, CA, U.S.A.]. Cases reported were classified as autochthonous when the dog in question had not travelled to other parts of the country (red circle), or as imported if they had travelled to other areas known as endemic (green circle). In addition, each site (geographic coordinates where the dog lives) was assigned corresponding altitude extracted from the Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) 90 masl resolution digital elevation model "Copyright DLR < 2000 >" using the Spatial Analyst Application (SAA) of the GIS software, and bioclimate using the spatial join-and-relate tool of the GIS software.

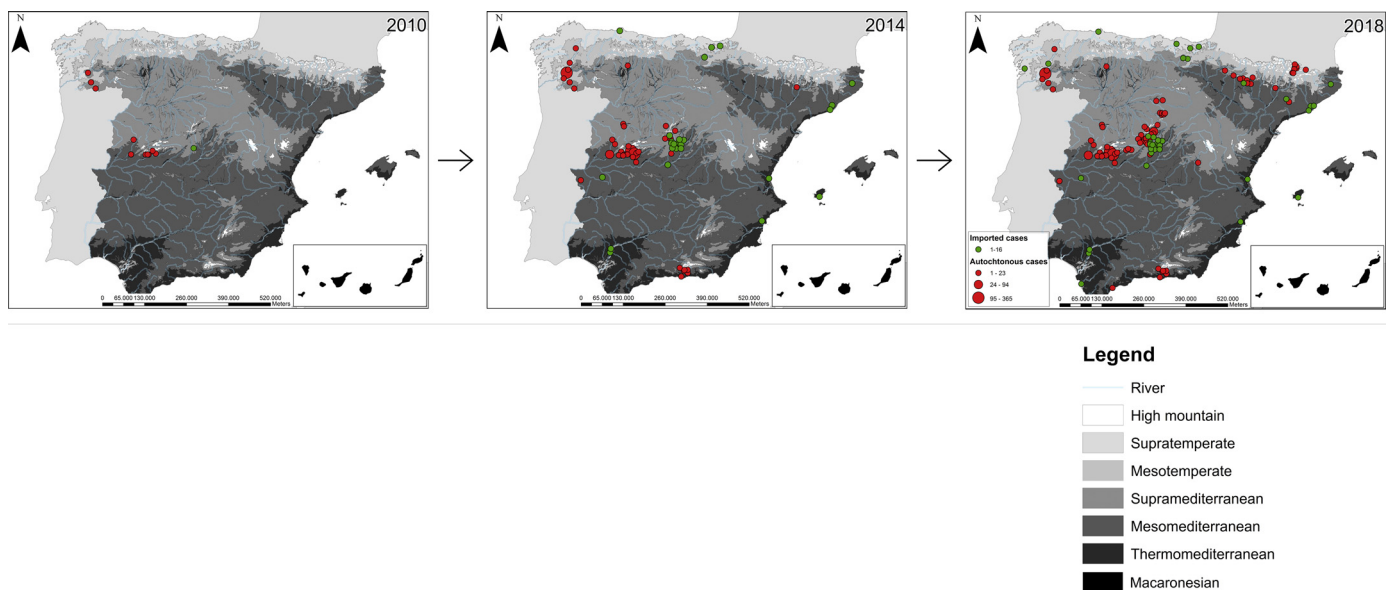
## 2.5. Statistical analysis

Data from all dogs in both the veterinary survey and prevalence study were subjected to statistical analysis. In a descriptive study, we analysed the variables recorded (lifestyle of the dog, breed, size, gender, age, number of *Thelazia* specimens, ocular signs using a grading system, use of preventive measures against *T. callipaeda* infection and travel history). The population sample was described in terms of distributions of continuous and categorical variables through their means, standard deviations (SD) and percentages. Associations between the number of *T. callipaeda* specimens presented and ocular stage of infection were assessed using the Spearman's rho test. In Study 2, correlations between *T. callipaeda* eye infection and the epidemiological variables described above were analyzed by the Chi-square test or T-Test, depending on the type of the variables involved. All statistical tests were performed using the Stata v. 15.0 package (Stata Corporation, College Station, TX, 2008). Significance was set at  $P \leq 0.05$ .



**Fig. 2.** Number and origin of records of *T. callipaeda* infestation in dogs for each year.

\*Cases previously reported in literature: 1 in 2010 (Guisado and Sanz, 2010), 2 in 2011 (Dacal et al., 2011; Loscertales, and Bonilla, 2014) and 26 in 2013 (Arias et al., 2013; González Jiménez et al., 2013; Sánchez-Murillo, et al., 2013).



**Fig. 3.** *T. callipaeda* dispersion model in Spain based on cumulative data for 2010, 2014 and 2018 (based on positive dogs geographic location from Study 1 and 2 and literature n = 1142).

High Mountain = T 3–8 °C; m -7 to -4 °C; M 0–3 °C; mean 2011, median 1984 (masl).

Supratemperate = T 7–12 °C; m -4 to 2 °C; M 3–10 °C; mean 967.11, median 925 (masl).

Mesotemperate = T > 12 °C; m > 2 °C; M > 10 °C; mean 332.62, median 312 (masl).

Supramediterranean = T 8–13 °C; m -4 to -1 °C; M 3–8 °C; mean 960.72, median 928 (masl).

Mesomediterranean = T 13–17 °C; m -1 to 5 °C; M 8–14 °C; mean 560.04, median 552 (masl).

Thermomediterranean = T 17–19 °C; m 5 to 10 °C; M 14–18 °C; mean 172.64, median 128 (masl).

Macaronesian (Thermo/Infra) = T 15– > 19 °C; m 7 to > 11 °C; M 14– > 18 °C; mean 102.5, median 64.5 (masl).

Temperature parameters: T = average monthly temperature; m = average minimum temperature of the coldest month; M = average maximum temperature of the coldest month; masl = metres above sea level.

### 3. Results

#### 3.1. Reports of *T. callipaeda* eye infection in dogs in Spain and Andorra

The resulting data analysed from both studies corresponded to 1114 cases of thelaziosis. Six hundred twenty-three out of 1114 presented clinical records and were included in the statistical analysis: 510 cases identified by veterinarians in Spain and Andorra in Study 1, and 113 cases detected among the 234 dogs examined in the prevalence study (Study 2). The corresponding sites of all 1114 cases were 121

municipalities of Spain and 6 municipalities of Andorra. In 86 of the 121 municipalities surveyed in Spain autochthonous cases were detected. All cases detected in the Andorran municipalities (n = 11) were also autochthonous.

The features of the positive dogs recorded in both studies (n = 623) are provided in Table 1. The following epidemiological factors were recorded in the cases detected, although it should be noticed that total numbers may vary due to some missing data. The uses given to dogs were 125 guard dogs (46.3 %), 102 hunting dogs (37.2 %) and 45 pets (16.4 %). The ratio between males and females was similar: 338 males

**Table 1**  
Features of the 623 clinical records of canine thelaziosis collected from May 2010 until December 2018.

Variable	N	%
<b>Use given</b>		
Hunting dog	102	37.23
Pet	45	16.42
Guard dog	125	46.35
<b>Size</b>		
Small (0.5 to < 15 kg)	132	22.80
Medium (15 to 30 kg)	248	42.83
Large (> 30 kg)	199	34.37
<b>Weight (Kg)</b>		
mean and SD	24.9	13.4
median, min/max numbers	25.0	1.0 / 86.0
<b>Sex</b>		
Male	338	55.32
Female	273	44.68
<b>Age in years</b>		
mean and SD	5.2	3.5
median, min/max numbers	5.0	0.2 / 16.0
Right eye	134	24.06
Left eye	205	36.80
Both eyes	218	39.14
<b>Ocular signs</b>		
	$P = 0.0018$	
Stage 1	203	37.11
Stage 2	299	54.66
Stage 3	32	5.85
Stage 4	13	2.38
<b>Use of effective nematocide</b>		
Yes	27	11.30
No	212	88.70
<b>Active principle</b>		
Milbemycin*	16	59.26
Moxidectin**	5	18.52
Selamectine (off-label)	6	22.22

\* Milbemycin: 0.5 mg/kg (two treatments separated by 7 days).

\*\* Moxidectin: 2.5 mg/kg.

(55.3 %) to 273 females (44.6 %). Mean weight and age were 24.9 kg (SD: 13.4) and 5.2 years (SD: 3.5), respectively. The mean number of parasites was 9.2 (SD: 16.7). One of the main characteristics of the population sample was that 88.7 % of the dogs had not been treated with preventive measures against *Thelazia*. The most frequently observed ocular signs were Stage 2 infection (299/547, 54.6 %), followed by Stage 1 (203/547, 37.1 %), Stage 3 (32/547, 5.8 %) and finally Stage 4 (12/547, 2.3 %).

Using the information obtained here and in these literature reports, in the present paper we map the geographic locations and cases of canine thelaziosis trend in Spain for 2010, 2014 and 2018 (Fig. 3).

According to these maps, mean and median altitudes recorded for autochthonous cases are 804.78 masl (SD: 377.50) and 789 masl respectively, with a minimum value of 7 and a maximum of 2321 masl. Case distributions according to the bioclimates of municipalities showing autochthonous cases of thelaziosis are: 11 in supratemperate zones, 1 in mesotemperate, 45 in supramediterranean, 32 in mesomediterranean and 3 in thermomediterranean (Fig. 3).

Our bivariate analysis revealed correlation between the presence of a large mean number of parasites and the severity of the ocular signs ( $P = 0.0018$ ) (Fig. 4).

### 3.2. Prevalence study (Study 2)

#### 3.2.1. Features of the dog populations and prevalences data

By site, *Thelazia* infection prevalences were 84/137 (61.3 %) (Site 1) and 29/97 (29.9 %) (Site 2), resulting Site 1 significantly more risky ( $P < 0.0001$ , odds ratio: 3.72, CI: 2.14–4.47 %) than Site 2. The features of these dogs are provided in Table 2. Mean weight and age were

20.4 kg (SD: 9.64 CI: 18.3–22.5 %) and 3.8 years (SD: 2.9 CI: 3.2–4.5 %) in Site 1; 25.02 Kg (SD: 15.2 CI: 21.2–28.9 %) and 5.4 years (SD: 4.0 CI: 4.5–6.2 %) in Site 2, respectively.

In Site 1, of the 137 dogs sampled, 124 (90.5 %) were hunting dogs, 10 (7.3 %) were guard dogs and 3 (2.2 %) were pets. Both genders were similarly represented: 52 females (38.0 %) and 85 males (62.0 %). Again, one of the main characteristics of the population sampled was that 73.6 % of the dogs had not received preventive treatment against *Thelazia* infection.

In Site 2, of the 97 dogs sampled, 48 (51.6 %) were pets, 43 (46.2 %) were guard dogs and 2 (2.2 %) were hunting dogs. Again, both genders were similarly represented: 52 females (55.2 %) and 43 males (44.8 %). None of these dogs had received preventive treatment against *Thelazia* infection.

#### 3.2.2. Bivariate analysis

Correlations between *T. callipaeda* infection and the different epidemiological factors in the two sites were assessed through bivariate analysis. Site 1 emerged as significantly more risky ( $P < 0.0001$ , odds ratio: 3.72, CI: 2.14–4.47 %) where dogs lived outdoors and were frequently used for hunting compared to Site 2, where the majority of the dogs were pets and guard dogs. *T. callipaeda* infection and the variables size and weight resulted significantly correlated in Site 1 ( $P = 0.03$  and  $P = 0.01$ , mean: 18.94, CI: 16.5–21.4) but no significant correlations were detected in Site 2 ( $P = 0.27$  and  $P = 0.56$ , mean: 27.21, CI: 20.1–34.4), respectively. Both genders were similarly affected: 34 females (65.4 %) and 50 males (58.8 %) in Site 1 and 16 females (30.2 %) and 13 males (30.2 %) in Site 2. So, no significant correlations were detected between *T. callipaeda* infection and the variables gender ( $P = 0.44$  in Site 1 and  $P = 1.00$  in Site 2) or age ( $P = 0.17$ , mean: 3.57, CI: 2.8–4.3 in Site 1 and  $P = 0.89$ , mean: 5.48 CI: 3.9–7.1 in Site 2). Moreover, a lack of specific preventive measures emerged as a risk factor for *T. callipaeda* infection in Site 1 ( $P < 0.0045$ , odds ratio: 0.22, CI: 0.07–0.65 %). This correlation cannot be studied in Site 2 due to the lack of treated dogs.

## 4. Discussion

In this study, we address the spread of thelaziosis in Spain focusing on the canine model as a possible future scenario for other European countries by examining cases of canine thelaziosis reported in the last decade in Spain.

Today, Spain is considered endemic for canine thelaziosis as reports exist of autochthonous cases in 86 municipalities belonging to 19 provinces. Further, here we report 11 new autochthonous cases in 6 municipalities of Andorra. The latitude (42 °N), climate, altitude and vegetation of this country are similar to those of other European countries and regions where thelaziosis is now considered endemic. Our research group has led the study of this parasitic disease in Spain (Miró et al., 2011; Montoya et al., 2011a, 2011b; Bello et al., 2012; Marino et al., 2015, 2016, 2018a, 2018b). It should also be noted that of the 623 cases of thelaziosis in Spain described by the present authors, most are here described for the first time (Fig. 2).

A higher prevalence of *T. callipaeda* infection in dogs has been described in Spain (up to 68 % in La Vera; Marino et al., 2018a) than in other European countries (47.5 % in the Bor District of Serbia, 23.1 % and 41.8 % in Italy and 3.8 % in Portugal) (Otranto et al., 2003a; Hadži-Milić et al., 2016; Maia et al., 2016). These apparently different prevalence levels compared to other countries could suggest a stable endemic condition, such that higher prevalences occur in places of established parasite infection (Miró et al., 2011; Maia et al., 2016; Marino et al., 2018a) or could be the outcome of underdiagnosis and/or underreporting in some countries. The lower prevalence of *T. callipaeda* in dogs in east-central Portugal, where reported cases were in close-by areas like Caceres and Orense, may be associated with the recently emergent character of the infection at the local level. Further

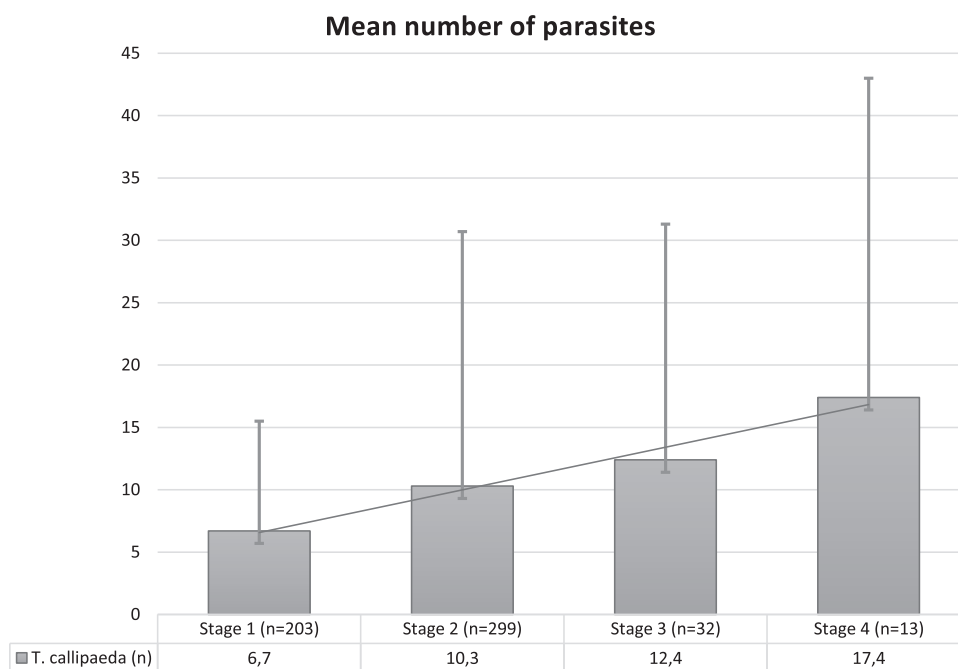


Fig. 4. Relationship between ocular stage and mean number of parasites.

Table 2  
Features of the dog population sampled (n = 234).

Variable	SITE 1				SITE 2				TOTAL	
	Positive		Negative		Positive		Negative		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>T. callipaeda infection</b>										
Year										
2016	0	0	0	0	12	38.71	19	61.29	31	13.25
2017	42	67.74	20	32.26	8	14.29	48	85.71	118	50.43
2018	42	56	33	44	9	90	1	10	85	36.32
Total									234	100
<b>Use given</b>										
Hunting dog	78	62.90	46	37.10	0	0	2	100	126	63.92
Pet	3	100	0	0	9	18.75	39	81.25	51	13.92
Guard dog	3	30	7	70	20	46.51	23	53.49	53	22.16
<b>Size</b>	<i>P</i> = 0.0307									
Small (0.5 to < 15 kg)	21	84	4	16	5	19.23	21	80.77	51	23.39
Medium (15–30 kg)	41	54.67	34	45.33	13	30.23	30	69.77	118	54.13
Large (> 30 kg)	12	57.14	9	42.86	11	39.29	17	60.71	49	22.48
<b>Weight (kg):</b>	<i>P</i> = 0.0120									
mean, SD	18.94 9.64		25.36 8.04		27.21 11.83		24.44 16.02		22.41 12.54	
and CI	16.49–21.39		21.36–29.35		20.06–34.35		19.83–29.04		21.10	
<b>Median</b>	19.10		28.30		29.00		22.00		21.10	
Min/max numbers	1 / 41		5 / 37		10 / 50		3 / 75		1 / 75	
<b>Sex</b>	<i>P</i> = 0.4442									
Male	50	58.82	35	41.18	13	30.23	30	69.77	128	54.94
Female	34	65.38	18	34.62	16	30.19	37	69.81	105	45.06
<b>Age (years):</b>	<i>P</i> = 0.1744									
mean, SD	3.57 2.76		4.59 3.15		5.48 3.61		5.34 4.11		4.65 3.57	
and CI	2.85–4.30		3.12–6.06		3.88–7.08		4.33–6.35		4.0	
<b>Median</b>	3.0		4.0		5.0		4.75		4.0	
Min/max numbers	0.30 / 10		0.30 / 13		0.40 / 13		0.60 / 17		0.30 / 17	
<b>Thelaziosis</b>	84	61.31	53	38.69	29	29.90	68	70.10	234	100
<b>Use of effective nematocide</b>	<i>P</i> = 0.0045, odds ratio: 0.22, CI: 0.07–0.65									
Yes	5	21.74	18	78.26	0	0	0	0	23	18.70
No	36	56.25	28	43.75	19	52.78	17	47.22	100	81.30
<b>Active principle</b>	<i>P</i> = 0.0040, odds ratio: 0.23, CI: 0.08–0.66									
Milbemycin	5	21.74	10	43.48	0	0	0	0	15	65.22
Moxidectin	0	0	5	21.74	0	0	0	0	5	21.74
Selamectine (off-label)	0	0	3	13.04	0	0	0	0	3	13.04

prevalence surveys are needed for a global vision of the current distribution of *T. callipada* infection in Europe.

At Site 1, a prevalence of 40 % had been reported in 2011 (Miró et al., 2011) and 68 % in 2018 (Marino et al., 2018a). Here the prevalence for this site was 84/137 (61.3 %). At Site 2, where a prevalence of 26.1 % was reported in 2018 (Marino et al., 2018a), the prevalence was 29/97 (29.9 %). Other prevalence data reported in a local veterinary journal are 19.5 % (15/77) in Jerre Valley (Caceres province) and 37.7 % (5/14) in Tormes Valley (Avila province) (González Jiménez et al., 2013). The population in Site 1 was classified as “high-risk owned dogs” and these dogs live outdoors and frequently participate in hunts. Moreover, such a high number of positive dogs at Site 1 could be explained also by the presence of *P. variegata*. In effect, the potential vector role of fruit flies was described for the first time in Spain in the La Vera region, as 7.5 % (28/371) of flies were found infected by PCR (Marino et al., 2018a). In the same study, *T. callipada* L3 was detected in two out of 155 flies from Site 1 dissected, while no flies from Site 2 were found to be infected by *T. callipada* after the dissection of 1088 flies (Marino et al., 2018a). It is likely that the percentage of positive flies is related to the degree of endemicity of the area, as was observed in Switzerland (Roggero et al., 2010).

In Site 1, *T. callipada* infection and the variables size and weight resulted significantly correlated ( $P = 0.03$  and  $P = 0.01$ , mean: 18.94, CI: 16.5–21.4). In this case, all small dogs are part of the same community, so that the community emerges as a confounding variable and these results are not interpretable. In addition, it should be taken into account that the size and weight variables are related to each other.

In our study, the most frequently observed ocular sign was Stage 2 infection (from mild conjunctivitis to chronic follicular conjunctivitis) (299/547, 54.7 %), followed by Stage 1 (no ocular signs) (203/547, 37.1 %), in agreement with previous and other studies (Miró et al., 2011; Maia et al., 2016). The mean number of parasites per dog was 9.2 (SD: 16.7) and correlation was observed between the numbers of parasites and the severity of ocular signs ( $P = 0.0018$ ), in disagreement with the findings of another study (González Jiménez et al., 2013).

We should also highlight the need to include this parasitosis in the differential diagnosis of ocular signs, especially in animals that live or have travelled to the aforementioned geographical areas. To date, only milbemycin and moxidectin have been registered against ocular thelaziosis in Europe (Motta et al., 2012; Otranto et al., 2016, 2019) so there are few prophylactic measures available for this specific parasite. An overall appropriate management of parasites is already broadly promoted in Europe, especially in view of their zoonotic potential (i.e. *Toxocara canis* or *Dirofilaria immitis*) and the use of macrocyclic lactones is already recommended for their treatment and prophylaxis, and this may have indirectly limited the spread of thelaziosis in some areas.

*T. callipada* nematodes require an insect vector for the development of their larval stages (L2 and L3) and thus the parasite's distribution should overlap the distribution range of the fruit fly *P. variegata*. The vector is present in many countries, even in those where no autochthonous cases of *T. callipada* have been described (Graham-Brown et al., 2016, 2017; Palfreyman et al., 2018). In Spain, it has been reported at three different sites (La Vera, El Escorial and Miraflores de la Sierra) (Marino et al., 2018a) with similar environmental characteristics.

*P. variegata* abundances have been reported to peak in mid-summer (August) in both the El Escorial municipality (Madrid province) and La Vera region (Caceres province) and temperatures have been positively correlated with fly density (Marino et al., 2018a), in line with data provided by studies in Italy (Otranto et al., 2006a). It should also be considered that owing to climatic change and the movement of dogs across Europe, the geographical ranges of many vector-borne diseases have expanded (Genchi et al., 2011; Colella et al., 2016; Palfreyman et al., 2018). Rising temperatures in North European countries could result in the geographic and seasonal expansion of *P. variegata* and thus of *T. callipada* infection in the presence of suitable hosts. To predict the

future distribution of *P. variegata*, it is important to characterize their preferred habitat (Otranto et al., 2006a; Palfreyman et al., 2018; Otranto and Deplazes, 2019). In the maps provided in this paper (Fig. 3), cases of canine thelaziosis mainly correspond to hilly areas (mean and median altitudes of 804.8 and 789 masl, respectively), where conditions are suitable for oak trees. In effect, 77 of 92 (83.7 %) municipalities harbouring autochthonous cases were assigned to a supramediterranean or mesomediterranean bioclimate, and to mean altitudes of 960.72 and 560.04 masl, respectively (Fig. 3).

Modelling the distribution of *T. callipada* in Spain is a valid tool to predict the spread of the parasite to other sites where it has already been reported or where its introduction is anticipated. Dogs are the main hosts of the nematode and have been considered sentinels in the spread of *T. callipada* infection (Otranto and Deplazes, 2019). Accordingly, the spread of the parasite in Spain over the past 10 years has been alarming. A better overview of the epidemiology of disease is key to improving control strategies. In future studies, GIS and remote sensing technologies could be used to address the epidemiology of the disease and its vectors.

It is easy to foresee that the ease and availability of air travel and consequent movement of large numbers of people and animals around the world, will lead to more cases of emerging zoonotic diseases in countries in which the corresponding disease is not yet endemic (Schäfer et al., 2019). Hence, under favourable conditions (such as the presence of suitable definitive and intermediate host, temperature and humidity adequate etc.), parasites could become established in new areas. Reports of cases of canine *T. callipada* infection in the UK indicate potential risks to the UK canine population of *T. callipada* infection via dogs travelling to or from European countries where the infection is already established (Graham-Brown et al., 2017). Importantly, the autochthonous nature of the vector throughout Europe is a risk factor for the dispersion of this infection.

To date, only some cases of human thelaziosis have been described in Europe (Fuentes et al., 2012; Gomez-Couso et al., 2013; López Medrano et al., 2015; Otranto and Dutto, 2008; Tasić-Otašević et al., 2016 and Paradžik et al., 2016). The known high prevalence of *T. callipada* infection in animals and its expanding geographical distribution means we have to be very aware of the possibility of new human cases of *T. callipada* infection in these endemic countries (Gordon et al., 2016).

A deeper awareness of the presence of this parasitosis may be useful. In effect, in a recent questionnaire-based survey, 7.1 % (10/141) of veterinarians interviewed were unaware of this parasite (Marino et al., 2018b). As a consequence, owners are not recommended appropriate prophylactic measures. Indeed, the regular use of moxidectin or milbemycin in endemic areas is highly recommended (Lia et al., 2004; Bianciardi and Otranto, 2005; Rossi et al., 2007; Ferroglio et al., 2008; Motta et al., 2012; Lechat et al., 2015; Otranto et al., 2016; Lebon et al., 2019). Interestingly, in both our survey of veterinary clinics and cross-sectional sampling study conducted in endemic areas, the great majority of dogs had not received treatment with an effective molecule against *T. callipada* (88.7 % and 81.3 %, respectively). Hence, informing veterinarians about the endemicity of *T. callipada* in Spain and its current distribution could help in the prevention of this parasitosis.

A wide range of animals can act as definitive hosts for *T. callipada* (Otranto et al., 2009). Wild animals are being increasingly found in urban environments. In this setting, direct links could be established between infected wildlife and domestic animals, which are more closely related to humans (Gordon et al., 2016; Otranto and Deplazes, 2019). In the endemic area of La Vera, there have been reports of two foxes with thelaziosis, which could mean the presence of a sylvatic cycle (Calero-Bernal et al., 2013). The role of foxes in spreading thelaziosis has been discussed elsewhere (Otranto et al., 2009; Gordon et al., 2016; Otranto and Deplazes, 2019). Foxes are heavily infected with *T. callipada* and prevalences of up to 27.7 % have been cited in Bosnia Herzegovina (Hodžić et al., 2014; Sargo et al., 2014), 29.4 % in Romania (Ioniță

et al., 2018) and 49.3 % in southern Italy (Otranto et al., 2009). However, the role of foxes in the spread of parasite has not yet been confirmed.

A sylvatic life cycle of infection could explain the presence of *T. callipaeda* in domestic and wild animals close to the Portuguese border. In northern-central Portugal, the nematode was detected in dogs, cats, red foxes, wild rabbits and a beach marten (Vieira et al., 2012; Pimenta et al., 2013; Sargo et al., 2014; Gama et al., 2016; Seixas et al., 2018) close to another focus of infection in Spain (Orense province). This indicates that this geographical area provides suitable habitats for *T. callipaeda* to complete its life cycle when the vector is present.

In Spain there have been 69 reported cases of thelaziosis in cats so far (Montoya et al., 2011b; Hernandez et al., 2012a; Marino et al., 2015). These cases suggest that *T. callipaeda* has adapted to domestic carnivores (dogs and cats) and spreads rapidly throughout Spain and Europe. While we still do not know the role that cats play in the spread of this ocular nematodosis, we recommend that canine and feline thelaziosis be included in the differential diagnosis of ocular pathologies. More studies are needed to assess the real prevalence of feline thelaziosis in Spain and other countries.

In conclusion, the data presented here confirm the endemic status of canine *T. callipaeda* infection in Spain, revealing high prevalences in dogs in both old and new endemic areas. Much remains to be known about the epidemiology of this infection, but we speculate that globalization, climate change, animal travel and the autochthonous and endemic nature of the vector are factors contributing to the rapid spread of this parasite, as it has been also discussed by other authors (Miró et al., 2011; Graham-Brown et al., 2017; Papadopoulos et al., 2017 and Hodžić et al., 2019). Our data also suggest that cases in Spain and possibly in other European countries are probably underdiagnosed and/or underreported.

Finally, we strongly recommend including thelaziosis in the differential diagnosis of pets and humans presenting ocular manifestations and to highlight the use of adequate preventive measures in endemic areas. The role of health education (on the part of the owners, veterinarians, general practitioners, health authorities etc.) under the umbrella of a One Health approach is essential for the management of this potential zoonotic disease.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the staff of the “Mon Veterinari Hospital” and especially Jordi Giné for reporting the cases of thelaziosis in the Principality of Andorra.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References

Anderson, R.C., 2000. *Thelazia*. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission, 2nd ed. .

Arias, M.S., Varela-López, O., González-Cantalapiedra, A., Cazapal-Monteiro, C., Gómez, D., Paz-Silva, A., Rosamanta, A., Sánchez-Andrade, R., 2013. Primer hallazgo de thelaziosis canina autóctona en Galicia. In: Presented at the XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA). Gran Canaria.

Bello, A., Hernandez, L., Checa, R., Dado, D., Montoya, A., Benito, M., Vazquez, M., Villagrasa, M., Miro, G., 2012. Situación epidemiológica actual de la thelaziosis ocular canina en España. XXIX Congr. Anu. AMVAC.

Bhaibulaya, M., Prasertsilpa, S., Vajrasthira, S., 1970. *Thelazia callipaeda* Railliet and Henry, 1910, in man and dog in Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19, 476–479.

Bianciardi, P., Otranto, D., 2005. Treatment of dog thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) using a topical formulation of imidacloprid 10% and moxidectin 2.5%. Vet. Parasitol. 129, 89–93.

Čabanová, V., Kocák, P., Vichová, B., Miterpáková, M., 2017. First autochthonous cases of canine thelaziosis in Slovakia: a new affected area in Central Europe. Parasit. Vectors 10.

Calero-Bernal, R., Otranto, D., Pérez-Martín, J.E., Serrano, F.J., Reina, D., 2013. First report of *Thelazia callipaeda* in wildlife from Spain. J. Wildl. Dis. 49, 458–460.

Caron, Y., Premont, J., Losson, B., Grauwels, M., 2013. *Thelazia callipaeda* ocular infection in two dogs in Belgium. J. Small Anim. Pract. 54, 205–208.

Colella, V., Kirkova, Z., Fok, É., Mihalca, A.D., Tasić-Otašević, S., Hodžić, A., Dantas-

Torres, F., Otranto, D., 2016. Increase in eyeworm infections in Eastern Europe. Emerg. Infect. Dis. 22, 1513–1515.

Colwell, D.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2011. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. Vet. Parasitol. 182, 14–21 Special issue: Zoonoses in a Changing World.

Dacal, V., Vázquez, L., Pato, F.J., Francisco, I., Cazapal-Monteiro, C., Romasanta, A., 2011. Hallazgo de infección por nematodos del género *Thelazia* (Boso, 1819) en un perro de Salamanca (España). Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 70, 109–113.

Diakou, A., 2017. *Thelazia callipaeda*: vigilance is the best course of action. Vet. Rec. 181, 344–345.

Dorchies, P., Chaudieu, G., Siméon, L.A., Cazalot, G., Cantacessi, C., Otranto, D., 2007. First reports of autochthonous eyeworm infection by *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs and cat from France. Vet. Parasitol. 149, 294–297.

Dumitrache, M.O., Györke, A., Mircean, M., Benea, M., Mircean, V., 2018. Ocular thelaziosis due *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae) in Romania: first report in domestic cat and new geographical records of canine cases. Parasitol. Res. 17 (12), 4037–4042.

Eser, M., Miman, Ö., Acar, A., 2018. *Thelazia callipaeda* (Railliet and Henry, 1910) case in a dog: first record in Turkey. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.

Farkas, R., Takács, N., Gyurkovszky, M., Henszelmann, N., Kisgergely, J., Balka, G., Solymosi, N., Vass, A., 2018. The first feline and new canine cases of *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae) infection in Hungary. Parasit. Vectors 11.

Ferroglio, E., Rossi, L., Tomio, E., Schenker, R., Bianciardi, P., 2008. Therapeutic and prophylactic efficacy of milbemycin oxime (interceptor) against *Thelazia callipaeda* in naturally exposed dogs. Vet. Parasitol. 154, 351–353.

Fidalgo, L.E., Lopez-Beeiro, A.M., Marino, V., Checa, R., Barrera, J.P., Montoya, A., Galvez, R., Miró, G., 2017. Impact of the dispersion of *Thelazia callipaeda* infection in wild animals: reporting cases in 34 foxes from Lugo and Ourense (Galicia-NW Spain). Xth Int. Symp. WILD FAUNA - IsoWIF 2017.

Fuentes, I., Montes, I., Saugar, J.M., Latrofa, S., Gárate, T., Otranto, D., 2012. Thelaziosis in humans, a zoonotic infection, Spain, 2011. Emerg. Infect. Dis. 18, 2073–2075.

Gajić, B., Bogunović, D., Stevanović, J., Kulišić, Z., Simeunović, P., Stanimirović, Z., 2014. Canine and Feline thelaziosis caused by *Thelazia Callipaeda* in Serbia. Acta Vet. (Beogr.) 64.

Gama, A., Pires, I., Canado, M., Coutinho, T., Lopes, A.P., Latrofa, M.S., Cardoso, L., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2016. First report of *Thelazia callipaeda* infection in wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Portugal. Parasit. Vectors 9, 236.

Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G., Genchi, M., 2011. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. Vet. Parasitol. 176, 295–299.

Gomez-Couso, H., A.-M. E., Gomez-Rial, M.A., Cid-Lama, A., 2013. Human thelaziosis in Galicia (Northwest Spain): report of a clinical case. In: Presented at the Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. Gran Canaria.

González Jiménez, R., Ríos, A., Montoya, A., 2013. Estudio epidemiológico de la thelaziosis canina en 91 perros de los valles del Jerte y del Tormes. Argos - Inf. Vet. 54–56.

Gordon, C.A., McManus, D.P., Jones, M.K., Gray, D.J., Gobert, G.N., 2016. The increase of exotic zoonotic helminth infections. Advances in Parasitology. Elsevier, pp. 311–397.

Graham-Brown, J., Gilmore, P., Colella, V., Moss, L., Dixon, C., Andrews, M., Arbeid, P., Barber, J., Timofte, D., McGarry, J., Otranto, D., Williams, D., 2017. Three cases of imported eyeworm infection in dogs: a new threat for the United Kingdom. Vet. Rec. 2017-104378.

Graham-Brown, J., Gilmore, P., Williams, D., Barber, J., Andrews, M., Timofte, D., 2016. Case of canine ocular thelaziosis in the UK. Vet. Rec. 179 51–51.

Guisado, A., Sanz, F., 2010. Conjunctivitis en un perro por *Thelazia callipaeda*. In: Presented at the 6° Congreso Andaluz de Veterinarios. Benalmádena (Málaga, España). Benalmádena, Malaga.

Hadži-Milić, M., Ilić, T., Stepanović, P., Dorđević, J., Dimitrijević, S., 2016. Serbia: another endemic region for canine ocular thelaziosis. Med. Weter. 72, 558–563.

Hammond, A., 2018. *Thelazia callipaeda* in a travelled dog in England. Vet. Rec. 183 477.1-477.

Hermosilla, C., Herrmann, B., Bauer, C., 2004. First case of *Thelazia callipaeda* infection in a dog in Germany. Vet. Rec. 154, 568–569.

Hernandez, L., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Bello, A., Vazquez, M.V., Benito, M., Villagrasa, M., Ribas, F., San Jorge, J., Miró, G., 2012a. Primera denuncia de la infección por *Thelazia callipaeda* en gatos en España. XXIX Congr. Anu. AMVAC.

Hinney, B., Fuehrer, H.P., Hodžić, A., Joachim, A., 2016. *Thelazia callipaeda* in dogs from Austria (abstract in German). In: Tag. DVG Fachgruppe BParasitologie Parasitäre Krankh. Berlin, Germany.

Hodžić, A., Latrofa, M., Annoscia, G., Alić, A., Beck, R., Lia, R., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2014. The spread of zoonotic *Thelazia callipaeda* in the Balkan area. Parasit. Vectors 7, 352.

Hodžić, A., Payer, A., Duscher, G.G., 2019. The first autochthonous case of feline ocular thelaziosis in Austria. Parasitol. Res. 118 (4), 1321–1324.

Hofmannová, L., Otáhal, M., Špirek, M., Modrý, D., 2019. The eyeworm *Thelazia callipaeda*: a new pathogen of dogs in the Czech Republic. Veterinárni lékař. 17, 19–22 [Abstract in English].

Ionică, A.M., Deak, G., Matei, I.A., D'Amico, G., Cotuțiu, V.D., Gherman, C.M., Mihalca, A.D., 2018. *Thelazia callipaeda*, an endemic parasite of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Western Romania. J. Wildl. Dis. 54, 829–833.

Ioniță, M., Mitrea, I.L., Ionică, A.M., Morariu, S., Mihalca, A.D., 2016. New cases of *Thelazia callipaeda* haplotype 1 in dogs suggest a wider distribution in Romania. Vector-Borne Zoonotic Dis. 16, 172–175.

Lebon, W., Guillot, J., Álvarez, M.-J., Bazaga, J.A., Cortes-Dubly, M.-L., Dumont, P., Eberhardt, M., Gómez, H., Pennant, O., Siméon, N., Beugnot, F., Halos, L., 2019. Prevention of canine ocular thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) with a combination of milbemycin oxime and afoxolaner (Nexgard Spectra®) in endemic areas in France and

- Spain. Parasite 26, 1.
- Lechat, C., Siméon, N., Pennant, O., Desquilbet, L., Chahory, S., Lesueur, C., Guillot, J., 2015. Comparative evaluation of the prophylactic activity of a slow-release insecticide collar and a moxidectin spot-on formulation against *Thelazia callipaeda* infection in naturally exposed dogs in France. Parasit. Vectors 8, 93.
- Lia, R.P., Traversa, D., Agostini, A., Otranto, D., 2004. Field efficacy of moxidectin 1 per cent against *Thelazia callipaeda* in naturally infected dogs. Vet. Rec. 154, 143–145.
- López Medrano, R., Guerra Calleja, G., Díez Morrondo, C., Panadero Fontán, R., 2015. Ocular thelaziosis, an emergent zoonosis in Spain. Med. Clin. (Barc.) 145, 317–318.
- Loscertales, B., Bonilla, M., 2014. Thelaziosis ocular canina en Sevilla | Argos Portal Veterinaria.
- Magnis, J., Naucke, T.J., Mathis, A., Deplazes, P., Schnyder, M., 2009. Local transmission of the eye worm *Thelazia callipaeda* in southern Germany. Parasitol. Res. 106, 715–717.
- Maia, C., Catarino, A.L., Almeida, B., Ramos, C., Campino, L., Cardoso, L., 2016. Emergence of *Thelazia callipaeda* infection in dogs and cats from East-Central Portugal. Transbound. Emerg. Dis. 63, 416–421.
- Malacrida, F., Hegglin, D., Bacciarini, L., Otranto, D., Nägeli, F., Nägeli, C., Bernasconi, C., Scheu, U., Balli, A., Marengo, M., Togni, L., Deplazes, P., Schnyder, M., 2008. Emergence of canine ocular thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in southern Switzerland. Vet. Parasitol. 157, 321–327.
- Marino, V., Gálvez, R., Colella, V., Sarquis, J., Checa, R., Montoya, A., Barrera, J.P., Domínguez, S., Lia, R.P., Otranto, D., Miró, G., 2018a. Detection of *Thelazia callipaeda* in *Phortica variegata* and spread of canine thelaziosis to new areas in Spain. Parasit. Vectors 11, 195.
- Marino, V., Gálvez, R., Montoya, A., Checa, R., Sarquis, J., Barrera, J.P., Miró, G., 2018b. A questionnaire-based survey about current situation of *Thelazia callipaeda* infection in Spain: update of reported cases. In: Presented at the XII Southern European Veterinary Conference. Madrid, Spain.
- Marino, V., Montoya, A., Checa, R., Gálvez, R., Miró, G., 2015. Actualización sobre la dispersión de la infección por *Thelazia callipaeda* en España. In: Presented at the XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA). Vitoria, Spain.
- Marino, V., Montoya, A., Checa, R., Gálvez, R., Miró, G., 2016. Situación de la thelaziosis en España: ¿Qué ha pasado en los últimos 5 años? In: Presented at the LI edición del Congreso Nacional de AVEPA. Granada, Spain.
- Mihalca, A., D'Amico, G., Scurtu, I., Chirilă, R., Matei, I., Ionică, A., 2015. Further spreading of canine oriental eyeworm in Europe: first report of *Thelazia callipaeda* in Romania. Parasit. Vectors 8, 48.
- Mihalca, A., Ionică, A.M., D'Amico, G., Daskalaki, A.A., Deak, G., Matei, I.A., Şimonca, V., Iordache, D., Modrý, D., Gherman, C.M., 2016. *Thelazia callipaeda* in wild carnivores from Romania: new host and geographical records. Parasit. Vectors 9.
- Miró, G., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Vázquez, M., Benito, M., Villagrana, M., Brianti, E., Otranto, D., 2011. *Thelazia callipaeda*: infection in dogs: a new parasite for Spain. Parasit. Vectors 4, 148.
- Montoya, A., V.M., Hernandez, L., Dado, D., Otranto, D., Miro, G., 2011a. Thelaziosis ocular canina. ¿Una parasitosis emergente en España? Consulta Difus Vet 178, 43–48.
- Montoya, A., Otranto, D., Vazquez, M.A., James, A., Hernandez, L., Checa, R., Dado, D., Miró, G., 2011b. Primer caso autóctono de la infección por *Thelazia callipaeda* en gatos en España. XII Congr. Ibérico Parasitol. Spain.
- Motta, B., Nägeli, F., Nägeli, C., Solari-Basano, F., Schiessl, B., Deplazes, P., Schnyder, M., 2014. Epidemiology of the eye worm *Thelazia callipaeda* in cats from southern Switzerland. Vet. Parasitol. 203, 287–293.
- Motta, B., Schnyder, M., Basano, F., Nägeli, F., Nägeli, C., Schiessl, B., Mallia, E., Lia, R.P., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2012. Therapeutic efficacy of milbemycin oxime/praziquantel oral formulation (Milbemax®) against *Thelazia callipaeda* in naturally infested dogs and cats. Parasit. Vectors 5, 85.
- Otranto, D., Brianti, E., Cantacessi, C., Lia, R.P., MáCa, J., 2006a. The zoophilic fruitfly *Phortica variegata*: morphology, ecology and biological niche. Med. Vet. Entomol. 20, 358–364.
- Otranto, D., Cantacessi, C., Testini, G., Lia, R.P., 2006b. *Phortica variegata* as an intermediate host of *Thelazia callipaeda* under natural conditions: evidence for pathogen transmission by a male arthropod vector. Int. J. Parasitol. 36, 1167–1173.
- Otranto, D., Colella, V., Crescenzo, G., Solari Basano, F., Nazzari, R., Capelli, G., Petry, G., Schaper, R., Pollmeier, M., Mallia, E., Dantas-Torres, F., Lia, R.P., 2016. Efficacy of moxidectin 2.5% and imidacloprid 10% in the treatment of ocular thelaziosis by *Thelazia callipaeda* in naturally infected dogs. Vet. Parasitol. 227, 118–121.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petric, D., Genchi, C., Capelli, G., 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. Parasit. Vectors 6, 16.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Mallia, E., Di Geronimo, P.M., Brianti, E., Testini, G., Traversa, D., Lia, R.P., 2009. *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in wild animals: report of new host species and ecological implications. Vet. Parasitol. 166, 262–267.
- Otranto, D., Deplazes, P., 2019. Zoonotic nematodes of wild carnivores. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.
- Otranto, D., Dutto, M., 2008. Human thelaziosis, Europe. Emerg. Infect. Dis. 14, 647–649.
- Otranto, D., Ferroglio, E., Lia, R.P., Traversa, D., Rossi, L., 2003b. Current status and epidemiological observation of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs, cats and foxes in Italy: a “coincidence” or a parasitic disease of the Old Continent? Vet. Parasitol. 116, 315–325.
- Otranto, D., Lia, R.P., Traversa, D., Giannetto, S., 2003a. *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) of carnivores and humans: morphological study by light and scanning electron microscopy. Parasitologia 45, 125–133.
- Otranto, D., Solari Basano, F., Pombi, M., Capelli, G., Nazzari, R., Falsone, L., Petry, G., Pollmeier, M.G., Lia, R.P., 2019. Effectiveness of the spot-on combination of moxidectin and imidacloprid (Advocate®) in the treatment of ocular thelaziosis by *Thelazia callipaeda* in naturally infected cats. Parasit. Vectors 12.
- Otranto, D., Traversa, D., 2005. *Thelazia* eyeworm: an original endo-and ecto-parasitic nematode. Trends Parasitol. 21, 1–4.
- Palfreyman, J., Graham-Brown, J., Caminade, C., Gilmore, P., Otranto, D., Williams, D.J.L., 2018. Predicting the distribution of *Phortica variegata* and potential for *Thelazia callipaeda* transmission in Europe and the United Kingdom. Parasit. Vectors 11.
- Papadopoulos, E., Komnenou, A., Thomas, A., Ioannidou, E., Colella, V., Otranto, D., 2017. Spreading of *Thelazia callipaeda* in Greece. Transbound. Emerg. Dis. 65 (1), 248–252.
- Paradžik, M.T., Samardžić, K., Živičnjak, T., Martinković, F., Janjetović, Ž., Miletić-Medved, M., 2016. *Thelazia callipaeda*—first human case of thelaziosis in Croatia. Wien. Klin. Wochenschr. 128 (5–6), 221–223.
- Pimenta, P., Cardoso, L., Pereira, M.J., Maltez, L., Coutinho, T., Alves, M.S., Otranto, D., 2013. Canine ocular thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Portugal: canine ocular thelaziosis in Portugal. Vet. Ophthalmol. 16, 312–315.
- Rodrigues, F.T., Cardoso, L., Coutinho, T., Otranto, D., Diz-Lopes, D., 2012. Ocular thelaziosis due to *Thelazia callipaeda* in a cat from northeastern Portugal. J. Feline Med. Surg. 14, 952–954.
- Roggero, C., Schaffner, F., Bächli, G., Mathis, A., Schnyder, M., 2010. Survey of *Phortica* drosophilid flies within and outside of a recently identified transmission area of the eye worm *Thelazia callipaeda* in Switzerland. Vet. Parasitol. 171, 58–67.
- Rossi, L., Bertaglia, P.P., 1989. Presence of *Thelazia callipaeda* Railliet & Henry, 1910, in Piedmont, Italy. Parasitologia 31, 167–172.
- Rossi, L., Rigano, C., Tomio, E., Frassetto, D., Ferroglio, E., 2007. Use of sustained-release moxidectin to prevent eyeworm (*Thelazia callipaeda*) infection in dogs. Vet. Rec. 161, 820–821.
- Ruytoor, P., Déan, E., Pennant, O., Dorchie, P., Chermette, R., Otranto, D., Guillot, J., 2010. Ocular Thelaziosis in dogs, France. Emerg. Infect. Dis. 16, 1943–1945.
- Sánchez-Murillo, J.M., Alarcón-Elbal, P.M., Sánchez-Moro, J., Bravo-Barriga, D., Blanco-Ciudad, J., Calero-Bernal, R., Frontera, E., Reina, D., 2013. Primer diagnóstico de thelaziosis ocular canina en la provincia de Badajoz (España). In: Presented at the XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA). Gran Canaria, Spain.
- Sargo, R., Loureiro, F., Catarino, A.L., Valente, J., Silva, F., Cardoso, L., Otranto, D., Maia, C., 2014. First report of *Thelazia callipaeda* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. J. Zoo Wildl. Med. 45, 458–460.
- Schäfer, I., Volkmann, M., Beelitz, P., Merle, R., Müller, E., Kohn, B., 2019. Retrospective evaluation of vector-borne infections in dogs imported from the Mediterranean region and southeastern Europe (2007–2015). Parasit. Vectors 12, 30.
- Seixas, F., Travassos, P., Coutinho, T., Lopes, A.P., Latrofa, M.S., Pires, M., dos, A., Cardoso, L., Otranto, D., 2018. The eyeworm *Thelazia callipaeda* in Portugal: current status of infection in pets and wild mammals and case report in a beech marten (Martes foina). Vet. Parasitol. 252, 163–166.
- Shen, J., Gasser, R.B., Chu, D., Wang, Z., Yuan, X., Cantacessi, C., Otranto, D., 2006. Human thelaziosis—a neglected parasitic disease of the eye. J. Parasitol. 92, 872–876.
- Shi, Y.E., Han, J.J., Yang, W.Y., Wei, D.X., 1988. *Thelazia callipaeda* (Nematoda: Spirurida): transmission by flies from dogs to children in Hubei, China. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 627.
- Soares, C., Sousa, S.R., Anastácio, S., Matias, M.G., Marquês, I., Mascarenhas, S., Vieira, M.J., de Carvalho, L.M., Otranto, D., 2013. Feline thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Portugal. Vet. Parasitol. 196, 528–531.
- Tasić-Otašević, S., Gabrielli, S., Trenkić-Božinović, M., Petrović, A., Gajić, B., Colella, V., Momčilović, S., Cancrini, G., Otranto, D., 2016. Eyeworm infections in dogs and in a human patient in Serbia: a one health approach is needed. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 45, 20–22.
- Tudor, P., Bădicu, A., Mateescu, R., Tudor, N., Mateescu, C., Ionaşcu, I., 2016. First report of canine ocular thelaziosis in the Muntenia Region, Romania. Parasitol. Res. 115, 1741–1744.
- Vieira, L., Rodrigues, F.T., Costa, Á., Diz-Lopes, D., Machado, J., Coutinho, T., Tuna, J., Latrofa, M., Cardoso, L., Otranto, D., 2012. First report of canine ocular thelaziosis by *Thelazia callipaeda* in Portugal. Parasit. Vectors 5, 124.



#### **5.4. Update on the treatment and year-round prevention of thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) in naturally infected dogs from Spain**

En este artículo se desarrolló el siguiente objetivo específico relacionado con el hospedador canino:

- v. Evaluar y comparar la eficacia terapéutica y profiláctica frente a la thelaziosis canina de diferentes formulaciones antiparasitarias.

La eficacia terapéutica y profiláctica de diferentes fármacos frente a la thelaziosis canina ha sido objeto de recientes investigaciones. La moxidectina y la milbemicina oxima son las únicas moléculas registradas en Europa para el tratamiento de la thelaziosis canina (Motta *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2016, 2019). El tratamiento mensual con milbemicina oxima es eficaz para el tratamiento y la profilaxis frente a la infección por *T. callipaeda* (Ferroglia *et al.*, 2008), y la aplicación mensual de una formulación de moxidectina al 2,5% e imidacloprid al 10% también ha demostrado ser eficaz para prevenir la infección por *T. callipaeda* (Lechat *et al.*, 2015). Sin embargo, hasta la fecha, han sido pocos los estudios realizados sobre la eficacia terapéutica y profiláctica de fármacos para el control de la thelaziosis canina que, como en este trabajo, involucren un elevado número de perros.

Para alcanzar este objetivo se realizó un seguimiento anual en España de tres poblaciones caninas con infección natural por *T. callipaeda*, procedentes de tres regiones endémicas:

Área de estudio 1. La Vera (Cáceres).

Área de estudio 2. El Escorial (noroeste de la Comunidad de Madrid).

Área de estudio 3. Miraflores de la Sierra (noroeste de la Comunidad de Madrid).

Los perros que cumplían los criterios de inclusión previstos por el estudio fueron incluidos aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento:

Grupo A: Milbemicina oxima 12,5 mg + praziquantel 125 mg (vía oral)

Grupo B: Moxidectina 10 g (vía subcutánea)

Grupo C: Moxidectina 2,5 mg/ml + imidacloprid 10 mg/ml (*spot-on*)

Grupo D: Ivermectina 10 mg/ml diluidos en propilenglicol (gotas oculares)

Los resultados obtenidos mostraron una eficacia de los tratamientos que varió desde un mínimo de 70,4% en el Grupo A una semana después del tratamiento, al 100% en los grupos B y C registrado los días 60 y 30 después del tratamiento, respectivamente. El tratamiento utilizado en el Grupo D resultó más eficaz que el del Grupo A (85,7% una semana después de su aplicación), pero nunca alcanzó una eficacia del 100% como en los grupos B y C.

Además, el número medio de parásitos se redujo significativamente a lo largo de las diferentes visitas en cada grupo de tratamiento, lo que confirma la eficacia de las cuatro formulaciones estudiadas.

En términos de tolerancia y seguridad, los tratamientos fueron bien tolerados por todos los perros de los Grupos A, B y C. Por el contrario, se registraron efectos secundarios como prurito, irritación y congestión en 15 de los 43 perros (34,9%) del Grupo D.

Por último, las eficacias de los tratamientos profilácticos fueron del 83,3%, 100%, 93,5% y 87,5% en los Grupo A, B, C y D, respectivamente.

**Publicación científica:**

**Marino, V., Gálvez, R., Mascuñán, C., Domínguez, I., Sarquis, J., Montoya, A., Pedro Barrera, J., Zenker, C., Checa, R., Hernández, M., Miró, G. (2021a).** Update on the treatment and prevention of ocular thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) in naturally infected dogs from Spain. *Int. J. Parasitol.* 51(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.08.007>

**Índice de impacto y posición de la revista en el área JCR (en su año de publicación):**

- Índice de impacto: 3,530
- Cuartil: Q1

Fuente: <https://www.recursoscientificos.fecyt.es/>





## Update on the treatment and prevention of ocular thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) in naturally infected dogs from Spain



Valentina Marino<sup>a</sup>, Rosa Gálvez<sup>b</sup>, Carmen Mascuñán<sup>c</sup>, Inés Domínguez<sup>d</sup>, Juliana Sarquis<sup>a</sup>, Ana Montoya<sup>a</sup>, Juan Pedro Barrera<sup>a</sup>, Clara Zenker<sup>d</sup>, Rocío Checa<sup>a</sup>, Mauro Hernández<sup>e</sup>, Guadalupe Miró<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Animal Health Department, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Specific Didactics, School of Education and Teacher Training, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup> La Cruz Verde Veterinary Clinic, Miraflores de la Sierra, Madrid, Spain

<sup>d</sup> La Plaza Veterinary Clinic, El Escorial, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Ocuvet Veterinary Clinic, Torreldones, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 April 2020

Received in revised form 23 July 2020

Accepted 4 August 2020

Available online 20 October 2020

#### Keywords:

Dogs

Ivermectin

Milbemycin oxime

Moxidectin

Prevention

*Thelazia callipaeda*

Treatment

### ABSTRACT

This study examines the therapeutic and year-round prophylactic efficacy of different formulations used in dogs in three Spanish areas where canine thelaziosis is endemic. The study was conducted as a Good Clinical Practice, multicentre, randomised field study in privately owned outdoor dogs naturally infected with *Thelazia callipaeda*. The active pharmaceutical ingredients tested were: an oral formulation of milbemycin oxime 12.5 mg combined with praziquantel 125 mg (A), a subcutaneous sustained-release formulation of moxidectin 10 g (B), a moxidectin 2.5% weight/volume (w/v) spot-on formulation combined with imidacloprid 10% w/v (C), and an eye drop formulation (6 µg) of ivermectin 10 mg/ml diluted 10% in propylene glycol (D). Infected dogs were randomly allocated to treatment Groups A, B, C and D. Dogs testing negative for *T. callipaeda* inspection in two visits (Day 7/Day 14 and D30) were enrolled in the prophylaxis trial and reallocated to the corresponding study group (A, B, C or D). Treatment efficacy ranged from 70.4% recorded in Group A 1 week after treatment, to 100% recorded in Group C on Day 30 and in Group B on Day 60. Treatment was more efficacious in Group D (85.7% 1 week after treatment) than A, but was never 100% efficacious as in Groups B and C. Year-round prophylactic efficacy was 83.3% in Group A, 100% in Group B, 93.5% in Group C and 87.5% in Group D. In conclusion, products containing moxidectin were highly efficacious both in treating and preventing canine thelaziosis. Milbemycin also emerged as a good option. However, the off-label use of topical or subcutaneous ivermectin should be avoided due to possible adverse reactions such as pruritus, irritation or redness. In endemic areas, monthly prophylaxis to limit the spread of *T. callipaeda* to new areas across Europe and reduce zoonotic risks is essential.

© 2020 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The nematode *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae) infests the eyes of dogs and cats as well as many other mammals, including humans. In their hosts, adult eyeworms reside under the eyelid, causing subclinical infection or ocular signs such as epiphora, photophobia, conjunctivitis, keratitis and ulcers (Anderson, 2000; Otranto and Traversa, 2005). In Europe, the vector and intermediate host of this nematode is the male drosophilid fly *Phortica variegata* (Diptera, Drosophilidae), which displays zoophilic behaviour by feeding on the host's lachrymal secretions (Otranto et al., 2006).

Due to its original distribution in eastern Asian countries, *T. callipaeda* was known as the "Oriental eyeworm" (Bhaibulaya et al., 1970; Shi et al., 1988; Anderson, 2000; Shen et al., 2006). This term is no longer appropriate because cases of *T. callipaeda* infection have been described in dogs and/or cats in many European countries including Italy, France, Germany, Switzerland, Spain, Portugal, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Croatia, Serbia, Romania, Greece, Bulgaria, Hungary, Slovakia, United Kingdom, Turkey, Austria, Czech Republic, Republic of Moldova, and Andorra (Colella et al., 2016; do Vale et al., 2019; Dumitrache et al., 2019; Hofmannová et al., 2019; Marino et al., 2020).

In humans, thelaziosis has been reported in Italy and France (Otranto and Dutto, 2008), Spain (Fuentes et al., 2012; López Medrano et al., 2015; Deltell et al., 2019) and, more recently, in Croatia, Serbia and Germany (Paradžik et al., 2016; Tasić-Otašević

\* Corresponding author.

E-mail address: [gmiro@ucm.es](mailto:gmiro@ucm.es) (G. Miró).



## 5.5. Feline thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) in Spain: state-of-the-art and first prophylactic trial in cats

En este artículo se desarrollaron los siguientes objetivos específicos relacionados con el hospedador felino:

- i. Determinar la prevalencia actual de la thelaziosis felina en áreas endémicas de España.
- ii. Determinar los factores de riesgo que influyen sobre la infección por *Thelazia callipaeda* en el gato.
- iii. Diseñar una clasificación clínica de los pacientes con thelaziosis felina.
- iv. Desarrollar mapas actualizados de la distribución geográfica de casos de thelaziosis felina en España desde su primera denuncia hasta la actualidad.
- v. Evaluar y comparar la eficacia terapéutica y profiláctica frente a la thelaziosis felina de dos formulaciones.

El papel epidemiológico de los gatos en la propagación de la thelaziosis ha sido poco estudiado hasta el momento. Los casos clínicos de thelaziosis felina son en su mayoría aislados, pero el papel del gato en la circulación del parásito puede ser solo aparentemente menor que el del perro (Tosco *et al.*, 2010; Motta *et al.*, 2014). Con este estudio se pretendió ampliar los conocimientos sobre la situación de la infección por *T. callipaeda* en la especie felina en España (prevalencia, factores de riesgo, clasificación clínica y difusión), valorar dos alternativas terapéuticas, y realizar el primer estudio profiláctico en la especie felina.

Para poder conseguir los objetivos propuestos, se realizaron tres estudios: a) Primer estudio, compendio de casos clínicos detectados en la red de clínicas veterinarias centinela, b) Segundo estudio sobre la prevalencia de la infección por *T. callipaeda* en el gato en zonas endémicas, y c) Tercer estudio, ensayo de eficacia terapéutica/profiláctica de dos formulaciones antiparasitarias.

a) Primer estudio: Detección de casos clínicos.

Se recopilaron 59 casos clínicos, detectados en el periodo comprendido entre octubre de 2010 y marzo de 2020, en 23 clínicas veterinarias en España.

b) Segundo estudio: Estudio sobre la prevalencia de la infección por *T. callipaeda* en el gato en zonas endémicas. Se incluyeron dos poblaciones de gatos procedentes de dos áreas endémicas de thelaziosis canina.

Los sitios de muestreo fueron:

Área de estudio 1. La Vera (Cáceres) y municipio de Candeleda (Ávila). Se examinó una población de 20 gatos en el año 2011.

Área de estudio 2. Orense (noroeste de España). Se examinaron 54 gatos en el año 2013.

Las prevalencias de infección por *T. callipaeda* registradas en los sitios de muestreo fueron de 8/20 (40%) en el Sitio 1 y 2/54 (3,7%) en el Sitio 2.

El 94% de los gatos con infección por *T. callipaeda* no había recibido ninguna medida preventiva específica frente a la infección. En este estudio no se observaron diferencias significativas con respecto a la edad o al peso. Aunque hubo una mayor prevalencia en hembras con respecto a los machos, este resultado no es concluyente debido al reducido tamaño muestral.

Asimismo, en este estudio se diseñó una clasificación clínica de los principales signos oculares que pueden afectar a los gatos con infección por *T. callipaeda*. En ella se definieron 3 estadios clínicos de la enfermedad (**Fig. 3** de la publicación 5.5.). Al igual que en la especie canina, se observó también una asociación entre la gravedad de la infección y la carga parasitaria.

Con el análisis de los resultados obtenidos en los estudios 1 y 2, se recopilaron un total de 69 casos clínicos de gatos que presentaban infección por *T. callipaeda* localizados en 26 municipios de España. En 18 de los 26 municipios los casos detectados fueron reconocidos como autóctonos.

Utilizando esta información se localizaron los centroides de las áreas geográficas donde se habían registrado casos de thelaziosis felina. El número de casos de *T. callipaeda* en

cada sitio se representó en el mapa con un círculo de tamaño acorde al número de casos (**Fig. 5** de la publicación 5.5.).

c) Tercer estudio: ensayos de eficacia terapéutica y profiláctica. Se reclutaron dos poblaciones de gatos con thelaziosis. Todos los gatos eran domésticos y tenían acceso al exterior. Se evaluó la eficacia terapéutica de una formulación de ivermectina 10 mg/ml diluida al 10% en propilenglicol (instilación ocular) en 12 gatos y una formulación *spot-on* de una combinación de 100 mg/ml de imidacloprid y 25 mg/ml de moxidectina en 7 gatos (4 de estos 7 gatos también se incluyeron en un ensayo de profilaxis de un año de duración).

Finalmente, los resultados obtenidos en el estudio de tratamiento demostraron que ambos principios activos evaluados fueron eficaces en el tratamiento de la thelaziosis felina, describiéndose una eficacia de entre el 91,7% (ivermectina ocular) el día 28 después inicio del tratamiento, al 100% (moxidectina *spot-on*) el día 15. El uso mensual de una formulación de moxidectina evitó la presencia de reinfección en los cuatro gatos incluidos a lo largo de un año.

**Publicación científica:**

**Marino, V., Montoya, A., Mascuñán, C., Domínguez, I., Gálvez, R., Hernández, M., Zenker, C., Checa, R., Sarquis, J., Barrera, J.P., Portero, M., Miró, G. (2021b).** Feline thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) in Spain: state-of-the-art and first prophylactic trial in cats. *J Feline Med Surg*; 1098612X21997625. <https://doi.org/10.1177/1098612X21997625>

**Índice de impacto y posición de la revista en el área JCR (en su año de publicación):**

- Índice de impacto: 1,393
- Cuartil: Q2

Fuente: <https://www.recursoscientificos.fecyt.es/>



# Feline thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) in Spain: state-of-the-art and first prophylactic trial in cats

Valentina Marino<sup>1</sup>, Ana Montoya<sup>1</sup>, Carmen Mascuñan<sup>2</sup>, Inés Domínguez<sup>3</sup>, Rosa Gálvez<sup>4</sup>, Mauro Hernández<sup>5</sup>, Carla Zenker<sup>3</sup>, Rocío Checa<sup>1</sup>, Juliana Sarquis<sup>1</sup>, Juan Pedro Barrera<sup>1</sup>, Miriam Portero<sup>6</sup> and Guadalupe Miró<sup>1</sup> 

Journal of Feline Medicine and Surgery  
1–12

© The Author(s) 2021  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/1098612X21997625  
journals.sagepub.com/home/jfm

This paper was handled and processed  
by the European Editorial Office (ISFM)  
for publication in *JFMS*



## Abstract

**Objectives** Thelaziosis caused by the nematode *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) affects the eyes of domestic and wild carnivores, lagomorphs and even humans. The role of cats in spreading thelaziosis remains unclear. The present study assesses the current status of feline *T callipaeda* infection in Spain and presents the results of the first prophylactic trial conducted in this species.

**Methods** We retrospectively analysed the occurrence of feline thelaziosis (study 1), examined its prevalence based on cross-sectional sampling of endemic areas (study 2), and assessed the therapeutic/prophylactic benefits of a spot-on (moxidectin) and therapeutic efficacy of an eye drop (ivermectin) formulation (study 3).

**Results** In study 1, 69 *Thelazia*-infected cats were examined. Autochthonous cases were detected in 18/26 municipalities surveyed in Spain, which corresponds to 88.4% (n = 61/69) of the total number of cases. In study 2, 74 cats (20 from La Vera region and 54 from Orense province) were examined from 2011 to 2013. Ten of these cats (13.5%) were infected with *T callipaeda*. The infection prevalence was 40% (n = 8/20) in La Vera and 3.7% (n = 2/54) in Orense. The therapeutic efficacy of ivermectin was assessed over a summer (2011) in 12 cats, while that of moxidectin was examined over a 17-month period in seven cats. Four of these seven cats were subsequently included in an all-year-round prophylaxis trial. Treatment efficacy ranged from 91.7% (ivermectin) on day 28 after treatment to 100% (moxidectin) on day 14. Moxidectin prevented reinfections in cats.

**Conclusions and relevance** Our data confirm the endemic status of *T callipaeda* infection in Spain, revealing its high prevalence in cats living in known endemic areas. Moxidectin was effective in treating and preventing infection. We strongly recommend the inclusion of thelaziosis in the differential diagnosis of pets and humans presenting with ocular manifestations, along with adequate preventive measures.

**Keywords:** Epidemiology; ocular infection; prevention; *Thelazia callipaeda*; treatment

**Accepted:** 30 January 2021

## Introduction

Thelaziosis is an emerging arthropod-borne disease caused by *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae), a nematode that, at both adult and larval stages, infects the eyes of domestic (ie, dogs and cats) and wild (eg, red foxes, wolves, beech martens, wild cats) carnivores,<sup>1,2</sup> lagomorphs (rabbits, brown hares)<sup>1,3</sup> and even humans.<sup>4–7</sup> *T callipaeda* was known as ‘the oriental eyeworm’, as it was thought to be confined to Asian countries, including India, Thailand, China and Japan.<sup>8</sup> However, following the first reports of *T callipaeda* infection in dogs in Italy,<sup>2,9</sup> the distribution of this ‘oriental eyeworm’ has since extended to larger parts of Europe, with enzootic areas in southern Europe.<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Animal Health Department, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>La Cruz Verde Veterinary Clinic, Miraflores de la Sierra, Madrid, Spain

<sup>3</sup>La Plaza Veterinary Clinic, El Escorial, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Specific Didactics, School of Education and Teacher Training, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>5</sup>Ocuvet Veterinary Clinic, Torreloz, Madrid, Spain

<sup>6</sup>Veterinary Teaching Hospital, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

### Corresponding author:

Guadalupe Miró Corrales DVM, PhD, Dipl EVPC, EBVS Veterinary Specialist in Parasitology, Animal Health Department, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Avda Pta de Hierro s/n, Madrid 28040, Spain  
Email: gmiro@ucm.es

## **6. DISCUSIÓN**

---



## 6. DISCUSIÓN

El conocimiento sobre la thelaziosis es muy reciente en nuestro continente lo que ha hecho necesario la realización de estudios sobre su epidemiología, diagnóstico, y control.

### 6.1. Fenología de *Phortica variegata*

#### 6.1.1. *Phortica variegata* como vector intermediario de *Thelazia callipaeda*

La detección de ADN de *T. callipaeda* en moscas recolectadas en el campo en la región de La Vera (Cáceres) en el estudio 5.1. arroja una prevalencia del 7,5% y es mayor que la registrada por Kozlov en 1962 (1,36%) (Kozlov, 1962) y más recientemente por Otranto *et al.* (2006b) (1,34%) y por Arme *et al.* (2019) (0,75%). Consideramos que un porcentaje tan elevado de moscas infectadas podría suponer un riesgo, provocando la ulterior propagación de esta parasitosis en España, ya que una prevalencia relativamente baja de vectores infectados es suficiente para mantener la infección en áreas altamente endémicas (Arme *et al.*, 2019). Recientemente se ha descrito un aumento en el número de casos de thelaziosis, tanto autóctonos como importados, en toda Europa (do Vale *et al.*, 2020). En España, hemos visto en esta memoria como los nuevos casos de thelaziosis están aumentando constantemente en diferentes partes del país, aunque hasta ahora, la presencia de *T. callipaeda* en *P. variegata* solo se había informado en Italia (Otranto *et al.*, 2006b). Si relacionamos la densidad de especímenes de *Phortica* spp. con la prevalencia de la infección por *T. callipaeda* en animales, las densidades de vectores pueden servir para evaluar la presencia de thelaziosis en un área determinada.

En La Vera, se encontraron, mediante disección, dos especímenes de *P. variegata* infectadas por este nematodo. Es muy importante destacar que el municipio de la Vera es una zona con un histórico de endemidad para esta parasitosis con respecto a los municipios de Madrid (San Lorenzo de El escorial y Miraflores de la Sierra), razón por la cual es posible que no se encontraran especímenes positivos a la infección natural por *T. callipaeda* en estos dos municipios. La prevalencia de moscas infectadas por *T. callipaeda* por disección e inspección visual fue considerablemente inferior al porcentaje

de moscas positivas mediante PCR. Las técnicas moleculares ofrecen una ventaja significativa en la investigación del papel vectorial de los artrópodos, teniendo en cuenta las principales limitaciones de la disección (la habilidad técnica y la baja sensibilidad de la detección directa) (Geden y Stoffolano, 1981; O'Hara y Kennedy, 1989).

Por otro lado, la detección de ADN del parásito en hospedadores artrópodos *per se* no demuestra su papel vectorial. Esto se debe a que no es posible diferenciar e incluso describir estadios larvarios en el caso de resultados positivos, y a que sería necesario realizar infecciones experimentales en los hospedadores para demostrar la posterior infección de los mismos con moscas positivas.

La caracterización molecular de los nematodos examinados procedentes de La Vera sirvió para confirmar la naturaleza idéntica de todas las secuencias de *cox1* a las del haplotipo 1 de *T. callipaeda*. Este haplotipo es el único que se ha detectado en personas y animales domésticos y silvestres circulando en Europa (Otranto *et al.*, 2005a). La presencia de un solo haplotipo en Europa puede ser el resultado de una adaptación genética específica de *T. callipaeda* h1 que permite su supervivencia y propagación, o bien que su propagación en Europa fue el resultado de la introducción de *T. callipaeda* h1 al continente (Otranto *et al.*, 2005c; Palfreyman *et al.*, 2018).

En este estudio, sólo se encontraron machos de *P. variegata* infectados por *T. callipaeda*, por lo que sólo los machos se pudieron incriminar como vectores de esta infección en condiciones naturales como apuntan otros autores (Otranto *et al.*, 2006b). La detección de *T. callipaeda* exclusivamente en especímenes machos de su vector artrópodo es de interés tanto desde el punto de vista parasitológico como biológico, y representa un caso único en el que una mosca drosófila macho que se alimenta de las secreciones del hospedador vertebrado puede transmitir un patógeno en condiciones naturales (Otranto *et al.*, 2008a).

La relación específica de *T. callipaeda* con el macho de su insecto vector y sus hospedadores mamíferos podría constituir un "modelo de embudo" de coevolución, en el que la presencia del parásito podría haber sesgado el comportamiento trófico de la mosca, aumentando en última instancia la transmisión. Por consiguiente, un posible escenario propuesto por Otranto *et al.* (2008) es que originalmente, *P. variegata* podría haberse alimentado ocasionalmente de secreciones lacrimales y *T. callipaeda* podría haber

utilizado esta mosca para completar su desarrollo. De la misma manera, es posible que la presencia de larvas de *T. callipaeda* en el digestivo y/o la proboscis de la mosca infectada podría haber “forzado” a *Phortica* a seguir alimentándose de secreciones lacrimales como fuente de alimento, debido a su aporte protéico o a algunos otros efectos desconocidos relacionados con la presencia del parásito. Cualquiera que sea el factor que haya conducido a este comportamiento parasitario de los machos de *P. variegata* constituye, a nuestro entender, un ejemplo singular en entomología médica y veterinaria; ya que suelen ser las hembras artrópodos y hematófagas las que se alimentan de sus hospedadores para complementar su ingesta de proteínas para el desarrollo gonadotrófico (Attardo *et al.*, 2005), teniendo un papel protagonista en la transmisión de agentes patógenos. Por todo ello, son necesarios nuevos estudios para dilucidar todos estos aspectos.

La relación entre *Thelazia* y otras moscas representa un interesante modelo de coevolución entre nematodos e insectos y parece sugerir que *T. callipaeda* está específicamente vinculada a una sola especie de vector en Europa (Otranto *et al.*, 2005c), reconociendo una estrecha asociación de este nematodo con las preferencias tróficas de su vector. La teoría de la coevolución está además apoyada por la presencia de un solo haplotipo circulante de *T. callipaeda* en Europa a pesar del diferente origen geográfico de los especímenes y la variedad de especies que pueden actuar como hospedadores definitivos (Otranto *et al.*, 2005c).

Finalmente, todas las moscas capturadas alrededor de los ojos del cebo humano, salvo muy pocas excepciones, durante el período de observación fueron *P. variegata*, lo que indica que existe una especificidad de esta mosca para los hospedadores humanos y animales. Esto también lo sustenta el hecho de que en un estudio previo realizado para identificar los vectores de *T. gulosa*, *T. rhodesi* y *T. skrjabini*, causantes de thelaziosis en el ganado vacuno, solo se capturaron ejemplares de *Musca* spp. alrededor de los ojos de los animales en pastoreo (Otranto *et al.*, 2003a) pero no de *Phortica* (Otranto *et al.*, 2006b), demostrando que *P. variegata* se ve atraída solo por sus hospedadores definitivos descritos.

### 6.1.2. Características climáticas y ecológicas que determinan la presencia de *Phortica variegata*

Las enfermedades transmitidas por vectores siguen patrones epidemiológicos complejos fundamentados en la interacción entre el patógeno, el vector y el hospedador (Matthews, 2011; Otranto y Eberhard, 2011; Otranto, 2018). Para poder analizar estas interacciones, es fundamental el conocimiento de la biología y distribución geográfica tanto del vector como de los hospedadores. En el caso de la thelaziosis, las denuncias de animales domésticos infectados, así como de otros hospedadores, incluidos los humanos, han ido aumentando exponencialmente en la última década en varios países europeos, lo que indica que la infección por *T. callipaeda* se está expandiendo por todo el continente. Probablemente esto se deba fundamentalmente a la globalización, y por lo tanto al movimiento de perros infectados hacia áreas donde el vector está presente, ya que *P. variegata* se distribuye de forma prácticamente ubiquista en toda Europa (Bächli *et al.*, 2004; “GBIF,” s.f.).

La implementación de modelos geoestadísticos que analicen las preferencias de *P. variegata* puede ser una herramienta útil para detectar si la infección por este verme ocular puede diseminarse localmente en diferentes contextos, cómo, y cuáles son los determinantes ambientales que potencialmente favorecen el establecimiento del vector a diferente escala. Se han elaborado mapas de idoneidad del hábitat de esta especie, que han reflejado un gran potencial de difusión en Europa (Otranto *et al.*, 2006a; Palfreyman *et al.*, 2018). Sin embargo, los datos sobre el origen del desarrollo de esos modelos son fragmentarios y, lo que es más importante, no hay información disponible sobre los parámetros ambientales que afectan la dinámica de la población de *P. variegata*, excepto los obtenidos en algunos lugares, como Italia (Otranto *et al.*, 2006a) y ahora España. Además, la distribución y la biología de estos insectos depende mucho del microhábitat y del microclima (Peterson y Shaw, 2003). Por ello, un análisis de las características climáticas en más sitios donde está presente el vector permitirá una mejor identificación de la dinámica de la población de *P. variegata* a lo largo de la temporada de riesgo y, en consecuencia, la posibilidad de elaborar modelos más exactos.

De los cuatro países muestreados en el artículo 5.2., *P. variegata* ha demostrado estar presente principalmente en España y en el centro-sur de Italia. Los primeros estudios sobre la distribución y el papel vectorial de esta drosófila se llevaron a cabo en Italia

(Otranto *et al.*, 2005a, 2006a, 2006b) cuando se dispararon las alarmas por el aumento de casos de infección por *T. callipaeda* en animales domésticos y silvestres (Otranto *et al.*, 2003a). En España, los primeros datos sobre la presencia de *Phortica* spp. se obtuvieron en 2015 en la región de la Vera (Marino *et al.*, 2015) donde se habían registrado los primeros casos de esta infección principalmente en perros (Miró *et al.*, 2011). Cabe mencionar que en La Granja (Segovia) también se recogieron 8 especímenes de *P. variegata* (Marino *et al.*, 2016), aunque este sitio de muestreo no se incluyó posteriormente en el presente trabajo.

#### 6.1.2.1. Variables climáticas

En nuestro estudio 5.1., observamos que los primeros especímenes se recolectaron en España entre los meses de abril y mayo, y se dejaron de capturar entre septiembre y principios de noviembre dependiendo del sitio de muestreo (La Vera, El Escorial, Miraflores de la Sierra) y del año, y coinciden con los resultados de estudios anteriores llevados a cabo en el sur de Italia y en Suiza (Otranto *et al.*, 2006b; Roggero *et al.*, 2010).

En referencia a los resultados obtenidos con el análisis de las variables climáticas en España, los presentes resultados muestran una correlación positiva directa entre la densidad total del vector y las temperaturas mínima y media del día de recolección. Además, se observó una correlación positiva entre el porcentaje de machos y la temperatura registrada en el momento de la captura. Queda patente que la duración del período de actividad de *Phortica* spp. está condicionada, en gran medida, por las condiciones climáticas. Las moscas se empezaron a recoger con unas temperaturas medias diarias de 11,8°C y una temperatura media mensual de 14,3°C. El número de moscas aumentó con el aumento de las temperaturas. Desde un punto de vista estacional, la máxima elevación de la población de machos de *P. variegata* en España se registró entre los meses de julio y septiembre, dependiendo del año, sugiriendo que estos son los períodos de mayor riesgo para los hospedadores carnívoros y los humanos en áreas donde la infección por *T. callipaeda* es endémica. Los rangos de temperatura descritos en este trabajo (medias diarias de 11,8-28,4°C) están en línea con los resultados proporcionados por otros estudios realizados en Italia (Otranto *et al.*, 2006a), donde observaron que *P. variegata* presenta una mayor actividad cuando la temperatura se sitúa alrededor de los 20-30°C. Además, en un estudio llevado a cabo en condiciones de laboratorio, se observó que la duración del ciclo biológico de este díptero se relacionaba con las temperaturas

registradas en el sitio de recolección de los especímenes, siendo el ciclo más corto para aquellas moscas recolectadas a temperaturas más altas (28°C) y más largo para las que se habían capturado a temperaturas más bajas (14°C) (Otranto *et al.*, 2012), confirmando una correlación negativa entre la duración de las fases del ciclo biológico y la temperatura. De la misma manera, estos resultados están en línea con los obtenidos en el estudio multicéntrico 5.2., en el que se observó una correlación positiva directa entre la densidad de machos y la temperatura, tanto examinando los resultados en su conjunto, como en el análisis de los diferentes sitios por separado; con excepción del área norte, es decir, New Forest, Reino Unido, en el que, sin embargo, el pequeño tamaño muestral no permitió obtener suficientes datos. En dicho estudio, al tomar muestras en un amplio rango de temperaturas, de 0 a 36°C, se pudo demostrar que la temperatura mínima diaria en la que se produjo la actividad lacrífaga tanto en machos como en hembras osciló entre 7 y 11°C, independientemente de la latitud. En relación con su actividad estacional, el número de moscas aumentó con el aumento de la temperatura, alcanzando su punto máximo en verano, especialmente en el mes de agosto, en todos los países muestreados.

Si analizamos estos resultados en el marco de un escenario de cambio climático global, el aumento de las temperaturas predicho por el IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) (Masson-Delmotte *et al.*, 2018) puede condicionar (posiblemente alargando) el período de actividad de *P. variegata* (Palfreyman *et al.*, 2018). Hay que tener en cuenta que, debido al cambio climático y al movimiento de animales en Europa, se ha ampliado la distribución geográfica de muchas enfermedades transmitidas por vectores (Genchi *et al.*, 2011; Colella *et al.*, 2016a; Palfreyman *et al.*, 2018). Así por ejemplo, el cambio climático ha podido condicionar el desplazamiento observado de garrapatas a altitudes y latitudes superiores, lo que afecta a la distribución y abundancia de las tres principales especies de garrapatas, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus* (Beugnet y Marié, 2009). También se considera que el cambio climático ha sido un factor determinante en la expansión de algunas especies de flebotomos, principales vectores de la infección por *Leishmania infantum* en Europa (Gálvez *et al.*, 2011; Chalghaf *et al.*, 2018; Semenza y Suk, 2018).

Por otro lado, en nuestro primer trabajo 5.1., no se detectaron correlaciones entre ninguna de las variables dependientes (densidad de moscas y porcentaje de machos) y la humedad relativa en el momento de la captura, el promedio de precipitación mensual o la

velocidad del viento. Al contrario, en nuestro segundo estudio 5.2., la densidad de machos mostró una correlación negativa con la humedad relativa en el momento de la captura y con la precipitación media mensual. Estos hechos parecen apoyar la hipótesis de que a mayor temperatura y menor humedad relativa (menos precipitaciones), los machos de *P. variegata* presentan su máxima actividad. En el estudio de estas variables a nivel global en el trabajo 5.2., se registró una correlación directa con la velocidad media del viento, así como una correlación inversa con la presión atmosférica y la humedad relativa. Cuando analizamos los resultados de los sitios de muestreo por separado, estas variables parecen tener una relación diferente según el contexto geográfico. De hecho, el viento y la humedad relativa se correlacionan negativamente con la densidad de los machos de *P. variegata* solo en Manziana (Italia) y El Escorial (Madrid), respectivamente, lo que indica que su efecto probablemente esté vinculado a situaciones locales. Una correlación negativa con la velocidad del viento es algo que cobra sentido, ya que éste podría afectar a la capacidad de vuelo de las moscas.

En referencia al reducido número de hembras de *P. variegata* capturadas alrededor de los ojos de humanos en tres sitios de muestreo (Oliveto Lucano, El Escorial y Highland Park) en la publicación 5.2., su presencia se relacionó positivamente con las horas de luz, la humedad relativa y la presión atmosférica, pero no con la temperatura. Sin embargo, incluso si consideramos esta observación como anecdótica y de poca relevancia epidemiológica (considerando el bajo número de hembras recolectadas en este estudio), parece que los determinantes ambientales asociados con las hembras son diferentes a los de los machos.

Explorando la variación de la dinámica poblacional de *P. variegata*, se observa una desproporción en la ratio macho/hembra favorable a los machos, siendo únicamente al final de la temporada, en el mes de octubre, cuando las capturas de hembras aumentan, aunque sin llegar a superar en ningún muestreo a la de los machos, a excepción de El Escorial en septiembre y octubre de 2016 cuando se recogieron porcentajes mayores de hembras. Este patrón parece sugerir que, después de hibernar, durante la primavera, los machos son más activos que las hembras. Esta variación en la proporción de machos y hembras, indica que se produce un cambio estacional en las necesidades/preferencias tróficas y/o en los patrones biológicos/reproductivos (Otranto *et al.*, 2006b). Este predominio de los machos que se encuentran alrededor de los ojos puede explicarse por

los hábitos alimenticios y sugiere que estos insectos complementan su ingesta de proteínas para el desarrollo gonadotrófico (revisado por Otranto *et al.*, 2006b). Sin embargo, aún no se han esclarecido completamente cuales son los requerimientos biológicos que subyacen a la lacrifagia de los insectos adultos, aunque es muy probable que se base en la necesidad de un mayor aporte proteico (Máca y Otranto, 2014). Todo esto, unido al papel protagonista que juegan los machos en la transmisión de la infección por *T. callipaeda*, justifica la existencia de una alta proporción de machos en las capturas (Otranto *et al.*, 2006b). Curiosamente, el porcentaje de machos y hembras recogidos a lo largo de la temporada reproductiva no fue homogéneo en todos los puntos de muestreo. En España, a medida que aumenta el número total de moscas al final del verano, también aumenta el número total de hembras. Estos resultados están en línea con un estudio anterior realizado en Suiza (Roggero *et al.*, 2010), según el cual, realizando la captura mediante una red entomológica (“manguero”) alrededor de los ojos de los perros, el 80,2% de especímenes de *Phortica* recolectadas eran machos, y solo había unas pocas hembras, la mayoría capturadas al final del verano. Contrariamente, en los otros sitios de muestreo del trabajo 5.2. (EE. UU., UK, Italia), la casi totalidad de los especímenes recolectados fueron machos, en línea con otros estudios que apuntan que las hembras de *P. variegata* no se alimentan alrededor de los ojos (Otranto *et al.*, 2006b).

Por lo tanto, a pesar de los estudios previos, aún se desconoce el comportamiento de estas moscas, especialmente en lo que respecta a sus necesidades alimenticias. Esta información puede ser crucial para el diseño de medidas preventivas tales como formulaciones repelentes dirigidas a evitar la alimentación de los vectores *Phortica* en sus hospedadores.

#### **6.1.2.2. Variables ecológicas**

Los sitios de recolección de *Phortica* spp. en el marco de la presente Tesis Doctoral se encuentran en su mayoría en las mismas latitudes que otros países europeos y asiáticos, donde la thelaziosis es endémica en el rango 39-46°Norte y donde la vegetación dominante también se ha asociado previamente con la presencia de moscas del género *Phortica* (Otranto *et al.*, 2003a; Dorchies *et al.*, 2007; Malacrida *et al.*, 2008; Roggero *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013; Hodžić *et al.*, 2014; Motta *et al.*, 2014; Diakou *et al.*, 2015; Mihalca *et al.*, 2015). En latitudes más septentrionales (New Forest, Reino Unido, 50° Norte) y en el único sitio de muestreo del continente

americano del estudio 5.2. (Highland Park, EE. UU.), *P. variegata* mostró un período de actividad mas corto, lo que podría explicarse por las condiciones climáticas menos adecuadas observadas en estos sitios en comparación con los lugares de muestreo de España e Italia. En el sitio de muestreo de EE. UU., la especie arbórea dominante es el roble rojo del norte (*Quercus rubra*), lo que reafirma la asociación entre los robles y la distribución de *P. variegata*. Asimismo, un sitio del centro de Italia donde *P. variegata* fue descrita por primera vez (Manziana), se caracterizó por ser un bosque en el que el roble de Turquía (*Q. cerris*) es muy abundante, lo que apoya las fuertes asociaciones ecológicas entre *P. variegata* y esta especie vegetal (Otranto *et al.*, 2006a; Palfreyman *et al.*, 2018), tal y como ha sido descrito por Otranto *et al.* (2006b). Cabe destacar que el piso bioclimático en el que se encuentran los bosques de robles, altamente asociados a la presencia de *P. variegata*, está presente en zonas con requerimientos moderados de humedad relativa (Rivas- Martínez, 1983). Como veremos en la sección 6.2. de la presente memoria, se ha observado que 77 de las 92 (83,7%) municipios con casos autóctonos de thelaziosis pertenecen a los bioclimas supramediterráneo o mesomediterráneo, con altitudes medias de 960,72 y 560,04 m s.n.m., respectivamente. En el estudio 5.2. la mayoría de los especímenes se recogieron en pisos bioclimáticos en los que predominaba esta especie vegetal (Otranto *et al.*, 2006a), pero los rangos de altitud oscilaron entre los 20 m s.n.m. (New Forest, Reino Unido) y los 1147 m s.n.m. (Miraflores de la Sierra, España), ampliando el rango de distribución indicado hasta el momento.

## **6.2. Estudios sobre la dispersión de la thelaziosis canina y felina en España**

### **6.2.1. Thelaziosis canina y felina en España como modelo de difusión en Europa**

En las publicaciones 5.1. y 5.3. sobre la difusión de la thelaziosis canina en España, abordamos la dispersión de los casos notificados en la última década como modelo de un posible futuro escenario extrapolable a otros países europeos. De igual forma, la publicación 5.5., representa la primera investigación epidemiológica sobre la prevalencia de *T. callipaeda* en gatos en España y así completa el mapa de difusión de esta parasitosis en carnívoros domesticos en nuestro país.

Nuestro grupo de investigación desde el principio ha sido un referente para la detección de nuevos casos de infección por *T. callipaeda* por medio de una red de veterinarios “centinela” que nos fueron notificando los diferentes focos que iban surgiendo a lo largo de la geografía española y, en consecuencia, ha liderado el estudio de esta enfermedad parasitaria en España desde el año 2010 (Miró *et al.*, 2011; Montoya *et al.*, 2011a; Bello *et al.*, 2012; Marino *et al.*, 2015, 2016, 2018c; Anexos VI, VII, X, XI, XIII). Cuando se describieron los primeros casos de thelaziosis en España, esta infección era ya ampliamente conocida en algunos países cercanos, como Italia y Francia (Otranto *et al.*, 2003a; Chermette *et al.*, 2004; Dorchies *et al.*, 2007). La hipótesis que se baraja es que la thelaziosis se introdujo en España a través de cazadores que viajaban con sus perros durante la temporada de caza (en otoño), supuestamente parasitados desde Italia a La Vera. Valga como ejemplo, la introducción desde Italia de liebres salvajes infectadas para cazar que se ha relacionado con brotes de casos de tularemia en animales y humanos en Dordoña (Vaissaire *et al.*, 2005).

La zona de La Vera también es un destino popular para las vacaciones de verano, especialmente para los ciudadanos franceses, que pudieron haber importado animales parasitados. En esta región, *T. callipaeda* podría haber encontrado las condiciones apropiadas para completar su ciclo biológico, favorecido tanto por la abundancia de un vector competente como por perros criados en el exterior.

Poco después, en el año 2011, se describieron los primeros casos de thelaziosis felina en esta zona (Montoya *et al.*, 2011b). La segunda provincia donde se denunció la presencia de casos autóctonos de thelaziosis canina fue Salamanca (Dacal *et al.*, 2011) y ya en 2012, otro de nuestros estudios demostró que en un total de 8 provincias se habían denunciado casos de thelaziosis canina y/o felina, entre las cuales Cáceres, Ávila, Toledo, Orense y Salamanca presentaban casos autóctonos. En especial, Orense se consideró como un segundo foco de infección debido a la presencia de un elevado número de gatos y perros infectados (Bello *et al.*, 2012). En un primer momento, la característica común de los animales diagnosticados fue su historial de viajes, pudiendo establecer dos focos para dicha parasitosis (región de la Vera -zona limítrofe con Cáceres, Ávila y Toledo- y la provincia de Orense). Además, en la misma época, empezaron a detectarse los primeros casos en personas: primero en Cáceres en 2011 (Fuentes *et al.*, 2012) y luego en Orense en 2012 (Gómez-Couso *et al.*, 2013).

Hasta 2014, los casos detectados en otras provincias españolas se correspondían con animales que habían viajado a las citadas zonas endémicas, pero a partir de investigaciones realizadas por nuestro grupo, se detectaron casos de thelaziosis en animales que no habían viajado. Las primeras provincias en denunciar la presencia de casos autóctonos de thelaziosis fueron: Barcelona (5), Granada (11), León (2), Lérida (2), Madrid y Segovia (Sierra de Guadarrama) (15) (Marino *et al.*, 2015, Anexo X). Al principio eran casos esporádicos detectados por diferentes clínicas veterinarias situadas a lo largo de la geografía española. Con el transcurso del tiempo, tanto el número de denuncias recibidas a través de nuestra red de veterinarios centinelas, como la prevalencia en zonas endémicas, fueron aumentando. Por lo tanto, estos casos representaron nuevas áreas de expansión del parásito en unos pocos años, demostrando la elevada capacidad de difusión de esta parasitosis.

En la actualidad, en España se ha realizado un análisis exhaustivo de la infección por *T. callipaeda* y se considera endémica en gran parte de su geografía ya que existen denuncias de casos autóctonos de thelaziosis canina en 86 municipios pertenecientes a 19 provincias. Los casos registrados en la población felina se localizan en 18 municipios pertenecientes a 8 provincias españolas. Estos datos demuestran que *T. callipaeda* se propaga rápidamente por España y por Europa.

El objetivo de este trabajo ha sido dar a conocer y valorar el impacto y la situación epidemiológica de la thelaziosis en nuestro país. Somos conscientes de la presencia de casos de thelaziosis en 19 provincias gracias a la colaboración de veterinarios clínicos, pero no se puede descartar que haya otras zonas afectadas. Cabe destacar que, en una encuesta dirigida a profesionales veterinarios, el 7,1% (10/141) de los veterinarios entrevistados desconocía la existencia de este parásito (Marino *et al.*, 2018c, Anexo XIII). Por tanto, es probable que haya un porcentaje de casos que no se diagnostique, y que haya una falta de recomendación de las medidas profilácticas adecuadas.

En la fase inicial de la infección y también en aquellas infecciones causadas por un número reducido de parásitos, los hospedadores a menudo no manifiestan signos clínicos y, por lo tanto, pueden pasar desapercibidos para los propietarios y veterinarios (Malacrida *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011; Motta *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2016). En consecuencia, el infradiagnóstico también puede tener un impacto elevado en la difusión silenciosa de esta parasitosis.

Parece interesante destacar que el análisis de los casos denunciados en la población felina demuestra que la difusión de esta parasitosis en el gato está siguiendo el mismo patrón que se ha presentado con anterioridad en el perro, registrándose en un primer momento dos focos de infección (La Vera y Orense), y ampliándose el número de denuncias a más provincias con el paso del tiempo. Esto confirmaría como la información obtenida sobre la distribución de la thelaziosis en un país pueda seguir el mismo patrón en otros hospedadores y, pueda así extrapolarse a otras zonas siendo una herramienta extremadamente útil para predecir su difusión. En Alemania, por ejemplo, se describieron los primeros casos de thelaziosis en 2004 (Hermosilla *et al.*, 2004). Se trataba de casos aislados de animales que habían viajado a zonas endémicas o de los que no se conocía la procedencia. Recientemente, se han ido multiplicando las denuncias de casos autóctonos presentes en ese país (Lebedewa *et al.*, 2020; Kregel-Weber *et al.*, 2021), demostrando que Alemania también podría convertirse en una zona endémica de la thelaziosis canina y felina, considerando que *P. variegata* es una especie endémica en Europa (Bächli, *et al.*, 2004; “GBIF,” s.f.).

Entre los factores que pueden haber contribuido a la difusión de la infección por *T. callipaeda* en España y en otros países europeos, destaca ciertamente la presencia de unas características bioclimáticas altamente favorables para su desarrollo. Los mapas elaborados en este trabajo (Fig. 2 de la publicación 5.3.) han permitido un estudio en profundidad de la evolución de los casos de thelaziosis canina detectados, proporcionando una imagen progresiva de la situación de esta parasitosis en España. Se ha observado que 77 de 92 (83,7%) municipios con casos autóctonos de thelaziosis pertenecen a los bioclimas supramediterráneo o mesomediterráneo, con altitudes medias de 960,72 y 560,04 m s.n.m., respectivamente. Dentro de España, reconocemos tres regiones corológicas o biogeográficas como son la Eurosiberiana, la Mediterránea y la Macaronésica (Rivas Martínez, 1983). A su vez, estas regiones se dividen en trece pisos bioclimáticos, entre los que se encuentran los bioclimas supramediterráneo y mesomediterráneo, pertenecientes a la región Mediterránea. Esta región Mediterránea se caracteriza por la presencia de abundantes precipitaciones en invierno y veranos secos (Rivas-Martínez *et al.*, 2011). El piso bioclimático supramediterráneo se halla muy extendido por toda la Península Ibérica y se caracteriza por una temperatura media anual comprendida entre 8° y 13°C, las medias de las temperaturas mínimas del mes más frío se sitúan entre -4° y -1°C, y las medias de las temperaturas máximas del mes más frío

entre 3° y 8°C. El piso mesomediterráneo es el de mayor extensión territorial en la Península Ibérica y se caracteriza por una temperatura media anual de 13° a 17°C, las medias de las temperaturas mínimas del mes más frío se sitúan entre -1° y 5°C, y las medias de las temperaturas máximas del mes más frío entre 8° y 14°C. Consideramos que la modelización geográfica a partir de técnicas geoestadísticas sobre la distribución de *T. callipaeda* en España, es una herramienta válida para predecir la propagación del parásito a otras localizaciones donde se haya descrito previamente su presencia o donde se prevé su posible introducción.

Por otro lado, la presencia de carnívoros silvestres (p. ej. zorros, lobos, etc.) podrían haber favorecido la propagación de la infección, tal y como demuestran los casos de infección denunciados en zorros en la misma zona de la Vera (Calero-Bernal *et al.*, 2013) y posteriormente en las provincias de Lugo y Ourense (López-Beceiro *et al.*, 2017, Anexo XII). Muchos autores han avalado la difusión de la infección por *T. callipaeda* a través de su ciclo silvestre (Otranto *et al.*, 2009c; Gordon *et al.*, 2016; Otranto y Deplazes, 2019). Además, una amplia variedad de animales puede actuar como hospedadores de *T. callipaeda* (Otranto *et al.*, 2009c). Los animales salvajes se encuentran cada vez más en contacto con entornos urbanos. En estas zonas de contacto, se podrían establecer vínculos directos entre la fauna infectada y los animales domésticos, a su vez estrechamente relacionados con las personas (Gordon *et al.*, 2016; Otranto y Deplazes, 2019). Las especies silvestres infectadas por *T. callipaeda*, incluso aquellas caracterizadas por hábitos predominantemente nocturnos, muestran un cierto grado de actividad diurna que puede variar según la estación (verano e invierno), particularmente durante el verano, periodo de máxima actividad de *P. variegata*; lo que explicaría la posible exposición de zorros, lobos, gatos salvajes, gardúñas y liebres al vector (Otranto *et al.*, 2009c). Algunos autores han relacionado la exposición de la fauna silvestre con el vector durante las horas tempranas del día o al atardecer, asumiendo estas horas como las horas de mayor presencia del vector (Otranto *et al.*, 2006a). En los estudios 5.1. y 5.2. del presente trabajo, se ha demostrado una correlación directa entre la temperatura y la presencia de *P. variegata*, en especial, la actividad del vector se asocia a una temperatura ambiental mínima de 7°C a 11°C. Esta información no resta importancia a la presencia de un ciclo silvestre, sino todo lo contrario, estando *P. variegata* presente a lo largo de todas las horas del día y, en consecuencia, favoreciendo su exposición a casi cualquier tipo de hospedador definitivo.

Aunque muchas especies de vida silvestre actúan como hospedadores de *T. callipaeda*, los zorros son probablemente los hospedadores más adecuados, debido a que presentan cargas parasitarias elevadas y se han citado prevalencias de hasta el 27,7% en Bosnia Herzegovina (Hodžić *et al.*, 2014), del 29,4% en Rumanía (Ionică *et al.*, 2018) y del 49,3% en el sur de Italia (Otranto *et al.*, 2009c). Desde el punto de vista veterinario, los zorros representan un importante reservorio silvestre de parásitos zoonóticos transmisibles a humanos y animales domésticos, como *Echinococcus multilocularis*, *Trichinella* spp., *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Taenia* spp., *Mesocestoides* spp., *Strongyloides stercoralis*, entre otros, especialmente en áreas rurales (Miterpáková *et al.*, 2009; Karamon *et al.*, 2018; Otranto y Deplazes, 2019) y otros no zoonóticos, pero no por ello menos importantes, como *Babesia vulpes* (Checa *et al.*, 2018) o *Angiostrongylus vasorum* (Gerrikagoitia *et al.*, 2010).

Un ciclo de vida silvestre podría explicar la presencia de la infección por *T. callipaeda* en animales domésticos y salvajes cerca de la frontera portuguesa. En el centro-norte de Portugal, este nematodo se detectó en perros, gatos, zorros, conejos silvestres y una garduña (Vieira *et al.*, 2012; Pimenta *et al.*, 2013; Sargo *et al.*, 2014; Gama *et al.*, 2016; Seixas *et al.*, 2018). Los casos de infección en Portugal se han descrito poco después de los primeros focos en España. Por la cronología y por su cercanía geográfica a los principales focos de infección, no podemos descartar que los casos de thelaziosis en Portugal hayan tenido su origen en España. De hecho, los primeros casos que se denunciaron en perros vivían en los municipios de Chaves, Vinhais y Bragança, que se encuentran en la frontera noroeste entre Portugal y España (Vieira *et al.*, 2012), mientras los casos en zorros se encontraron en los municipios de Montalegre y Sabugal (Sargo *et al.*, 2014). Cabe destacar que también se diagnosticó un conejo parasitado en el mismo municipio de Vinhais (Gama *et al.*, 2016).

A pesar de que la fauna silvestre puede desempeñar un papel en el mantenimiento y la propagación de *T. callipaeda* (Otranto *et al.*, 2007), todo apunta a que la presencia de la thelaziosis canina y felina en Europa es más probablemente una consecuencia de la globalización y, por tanto, del aumento de la movilidad de los perros (de caza, turismo internacional), con el consiguiente aumento de la circulación del parásito (Otranto *et al.*, 2003a; Dorchies *et al.*, 2007; Malacrida *et al.*, 2008; Ruytoor *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2011). Es fácil prever que la facilidad y disponibilidad de los viajes aéreos y el

consiguiente movimiento de un gran número de personas y animales en todo el mundo, conducirán a más casos de enfermedades zoonóticas emergentes en países donde no son todavía endémicas (Maia y Cardoso, 2015; Schäfer *et al.*, 2019). Por lo tanto, en condiciones favorables (presencia del hospedador y el vector, con temperaturas y humedad adecuadas, etc.), los parásitos podrían establecerse en nuevas áreas. La distribución del parásito está ligada al rango de distribución de su vector, *P. variegata*, que está ampliamente distribuido en el continente europeo, incluso en aquellos países donde aún no se han descrito casos autóctonos de *T. callipaeda* como en el caso de Reino Unido (Gibbs, 2003; Clemons, 2009; Chandler, 2014; Falk, 2015; Graham-Brown *et al.*, 2016, 2017; Palfreyman *et al.*, 2018). Los casos de infección canina por *T. callipaeda* en el Reino Unido indican un potencial riesgo mediante la introducción de perros que viajan desde países europeos endémicos (Graham-Brown *et al.*, 2017). Es importante destacar que la naturaleza autóctona del vector en toda Europa es un factor de riesgo para la dispersión de esta infección. Se ha propuesto el establecimiento de un sistema de vigilancia interdisciplinar bajo el enfoque de *One Health* que integre la Salud Pública humana y veterinaria para una gestión más eficaz de muchas enfermedades vectoriales (Otranto *et al.*, 2009b). Este sistema de vigilancia sería importante para garantizar un adecuado estado de salud de los animales de compañía transportados, en movimiento entre países de la UE, y para asegurar que los animales estén vacunados y libres de parásitos. Esto evitaría la posible propagación de patógenos a áreas no endémicas. En consecuencia, los perros que viajen desde áreas endémicas a no endémicas necesitarían un pasaporte que tendría como objetivo minimizar el riesgo de introducción de enfermedades y certifique que el perro ha sido tratado con un antiparasitario de amplio espectro 24–48 h antes del viaje (Otranto *et al.*, 2009b).

Hasta la fecha, solo se han descrito algunos casos de thelaziosis humana en Europa (Otranto y Dutto, 2008; Fuentes *et al.*, 2012; Gómez-Couso *et al.*, 2013; López Medrano *et al.*, 2015; Tasić-Otašević *et al.*, 2016; Paradžik *et al.*, 2016; Dolff *et al.*, 2020 y Martínez-Sánchez *et al.*, 2021). La alta prevalencia conocida de la infección por *T. callipaeda* en animales y su distribución geográfica en expansión implica una alta probabilidad de que se presenten nuevos casos de thelaziosis humana en estos países endémicos (Gordon *et al.*, 2016).

### 6.2.2. Estudios sobre la prevalencia de la infección por *Thelazia callipaeda* en el perro y en el gato

Una vez analizada la distribución de la thelaziosis en España y cuáles son los factores que han contribuido a su difusión tanto en nuestro país como en Europa, vamos a analizar, a grandes rasgos, cuáles son las prevalencias de infección denunciadas en el perro y el gato.

En España se han descrito prevalencias superiores a las de otros países europeos (**Tabla VII**, del apartado 2.2.2. de epidemiología). Estos niveles de prevalencia aparentemente diferentes podrían sugerir una condición endémica estable, de manera que se registran prevalencias más altas en los lugares iniciales donde se estableció esta infección parasitaria (Miró *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2016; Marino *et al.*, 2018a). La descripción de una prevalencia del 60,1% en el municipio de Accettura (Matera), en el Sur de Italia (Otranto *et al.*, 2003a), que fue uno de los primeros “focos” de thelaziosis en Europa, avalaría esta hipótesis. En consecuencia, una menor prevalencia de *T. callipaeda* en perros en el centro-este de Portugal, a pesar de la cercanía geográfica de provincias con alta incidencia de thelaziosis como Cáceres y Orense, podría estar asociada con el carácter emergente reciente de la infección a nivel local.

Los datos de prevalencia obtenidos en la población canina en este estudio proceden de municipios pertenecientes a tres provincias: Cáceres, Ávila y Madrid. En la región de la Vera, primera zona endémica detectada en España, se llevaron a cabo tres estudios epidemiológicos entre los años 2010 y 2018 (**Tabla XIII**).

**Tabla XIII.** Estudios sobre la prevalencia de la infección por *Thelazia callipaeda* en perros y gatos (G) realizados en España.

	2010/2011	2013	2016	2017	2018
<i>La Vera (Cáceres)</i>	39,9% (182/456) <sup>a</sup> G: 40% (8/20) <sup>c</sup>			68% (51/75) <sup>c</sup> 67,7% (42/62) <sup>c</sup>	56% (42/75) <sup>c</sup>
<i>Valle del Jerte (Cáceres)</i>		19,5% (15/77) <sup>b</sup>			
<i>Valle del Tormes (Ávila)</i>		37,7% (5/14) <sup>b</sup>			
<i>El Escorial (Madrid)</i>			38,7% (12/31) <sup>c</sup>	26,1% (23/88) <sup>c</sup> 14,3% (8/56) <sup>c</sup>	90% (9/10) <sup>c</sup>
<i>Miraflores de la Sierra (Madrid)</i>				33,1% (41/124) <sup>c</sup>	
<i>Orense</i>		G: 3,7% (2/54) <sup>c</sup>			

<sup>a</sup> Miró *et al.*, 2011

<sup>b</sup> González Jiménez *et al.*, 2013

<sup>c</sup> Datos obtenidos en el marco de la presente Tesis Doctoral

A día de hoy, se han llevado a cabo dos estudios de prevalencia en gatos en Europa: uno en Suiza y otro en Portugal con prevalencias del 0,8% (17/2171 gatos examinados) y 23,5% (4/17 gatos examinados), respectivamente (Motta *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2016). El resto de los estudios son principalmente descripciones de casos aislados (Tabla 1 de la publicación 5.5.), uno de los cuales fue un gato importado a Alemania desde el sur de España (Silva *et al.*, 2020). Los estudios de prevalencia en la población felina en esta Tesis Doctoral se realizaron en La Vera y en Orense (Tabla XIII). En este trabajo, se describió una prevalencia del 40% en la provincia de Cáceres (La Vera) y del 3,7% en la de Orense. La población en ambos sitios estuvo representada por gatos que tenían acceso al exterior.

En La Vera, al tratarse del primer foco en toda España, las altas prevalencias de la infección por *T. callipaeda* detectadas tanto en perros como en gatos fueron las esperadas, confirmándose esta región como un foco instaurado y establecido de la infección. Por el contrario, las prevalencias de infección registradas en perros en los otros dos puntos de muestreo de Madrid (El Escorial y Miraflores de la Sierra), siete años después de la detección del primer foco de infección en La Vera, fueron inesperadas, ya

que los perros infectados no habían viajado a zonas endémicas. Hasta donde sabemos, los datos de thelaziosis canina en la Comunidad de Madrid solo provenían de casos importados de la región de la Vera. Estos nuevos hallazgos hicieron considerar ahora estas áreas del centro de España como autóctonas para la thelaziosis canina, con lo cual representan la emergencia de focos autóctonos de la infección. No hemos realizado estudios sobre la prevalencia de la infección en la especie felina en estas dos áreas, pero sí somos conscientes de la presencia de un elevado número de casos clínicos en gatos que viven en estas zonas (Marino *et al.*, 2016).

En el presente trabajo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las prevalencias entre los grupos de perros de los tres sitios muestreados (La Vera, El Escorial y Miraflores de la Sierra), registrándose un mayor riesgo de infección en la región de la Vera con respecto a los otros dos sitios. De la misma manera, hubo diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia detectada en la población felina de La Vera y la de Orense. Un número tan alto de gatos positivos en La Vera confirma también la endemidad de la thelaziosis en esta región.

Una de las posibles razones de esta diferencia en la población canina puede ser, como se ha comentado anteriormente, el hecho que la infección se ha establecido recientemente en los últimos años en los municipios del Escorial y de Miraflores de la Sierra si lo comparamos con La Vera. Por otro lado, la población canina de La Vera se clasificó como "de alto riesgo" porque estos perros vivían al aire libre y una gran mayoría de ellos vivían en colectividad, sin recibir los cuidados que suelen tener los perros domésticos, que, aunque teniendo acceso al exterior, en casas con jardín o fincas, no están sujetos al mismo riesgo que un animal que vive en el campo y se considera como un "perro de trabajo". De hecho, se ha demostrado que los perros de pastoreo y de granja, al pasar la mayor parte del tiempo al aire libre, tienen un riesgo significativamente mayor de entrar en contacto con el vector y adquirir la infección (Calero-Bernal *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2016). Del mismo modo, otros autores describieron un mayor grado de infección en los perros que tenían contacto con otros animales (perros, gatos, ganado y/o aves de corral), probablemente debido a una mayor atracción de *P. variegata* hacia lugares con mayor número de hospedadores (Maia *et al.*, 2016). Asimismo, el papel vectorial de *P. variegata* se describió por primera vez en España en la región de la Vera como hemos visto en la sección 5.1. de Resultados de esta Tesis Doctoral, ya que en el

7,5% (28/371) de las moscas recolectadas, se detectó ADN de *T. callipaeda* mediante la técnica de PCR. Es probable que el porcentaje de moscas positivas esté relacionado con el grado de endemidad de la zona, como se observó en Suiza (Roggero *et al.*, 2010) donde se describió un mayor número de especímenes de *P. variegata* en un área endémica de thelaziosis con respecto a otras áreas donde no se había descrito la presencia del parásito. En España, la presencia de *P. variegata* se ha descrito en tres sitios diferentes (La Vera, El Escorial y Miraflores de la Sierra) con bioclimas similares. Este hecho, justifica también la prevalencia del 40% detectada en la población felina de La Vera. Por otro lado, una prevalencia del 3,7% en Orense está en la media de las descritas en otros estudios realizados en Europa (Motta *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2016).

#### **6.2.2.1. Variables epidemiológicas analizadas en el perro y en el gato**

Sobre las variables epidemiológicas, los factores que se encontraron positivamente asociados a la presencia de la infección por *T. callipaeda* en uno de los sitios de muestreo (La Vera) fueron el tamaño y el peso de los perros, mientras el uso de medidas profilácticas eficaces frente a *T. callipaeda* se asoció negativamente con el desarrollo de la infección. En el caso de los gatos, desafortunadamente, las variables epidemiológicas solo se conocían para los gatos procedentes de La Vera, por lo que no se pudo realizar una comparación entre las poblaciones. El único factor que se asoció a la presencia de la infección por *T. callipaeda* en los gatos fue el sexo siendo las hembras las que presentaron valores de prevalencias más elevados. Cabe destacar, que el 94% (47/50) de los gatos infectados por *T. callipaeda* no habían recibido ninguna medida preventiva específica frente a la infección, lo cual resultó ser un factor de riesgo en la población canina.

No se detectaron correlaciones significativas entre la infección por *T. callipaeda* en el perro y la variable género. El sexo por lo general no se considera un factor determinante, aunque en la literatura se han observado resultados contradictorios (Otranto *et al.*, 2003a; Malacrida *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011). Resultados similares a los de este estudio en la población canina fueron descritos por Otranto *et al.* (2003) y Miró *et al.* (2011), mientras los estudios retrospectivos realizados por do Vale *et al.* (2020) detectaron un mayor índice de infección en los machos en el caso de perros, gatos y zorros. En estas últimas dos especies podría ser consecuencia del comportamiento territorial de los machos. En nuestro estudio, en la población felina, aparece una mayor

prevalencia en hembras con respecto a los machos, este resultado puede relacionarse con un cierto grado de inmunocompromiso que pueden presentar las gatas durante el celo. Sin embargo, en muchos casos se desconocía el estado reproductivo de las gatas, por lo que serían necesarios más estudios para poder avalar esta hipótesis, sobre todo teniendo en cuenta que otros estudios describieron un mayor riesgo de infección en los machos (Motta *et al.*, 2014).

Por su parte, la edad no resultó ser un factor de riesgo ni en la población canina ni en la felina, aunque es razonable pensar que los animales adultos tengan una mayor predisposición a la infección por pasar más tiempo expuestos a lo largo de su vida. De hecho, varios autores describen prevalencias más bajas en perros jóvenes (Dorchies *et al.*, 2007; Malacrida *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011; do Vale *et al.*, 2020).

Por otro lado, la correlación entre la infección por *T. callipaeda* y las variables epidemiológicas tamaño y peso fueron estadísticamente significativas en uno de los sitios de muestro de la especie canina (La Vera). Teniendo en cuenta que las variables tamaño y peso están a su vez relacionadas entre sí, es esperable que esta asociación haya sido observada también por otros autores que describen prevalencias más bajas en perros de razas pequeñas (Dorchies *et al.*, 2007; Malacrida *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011; do Vale *et al.*, 2020). Los perros de bajo peso y pequeño tamaño parecen estar menos expuestos a la infección. Esto podría atribuirse a que es más probable que los perros de menor tamaño vivan en el interior de las casas y que por tanto estén menos expuestos.

En cuanto a la carga parasitaria, en los resultados de este trabajo, el número medio de parásitos en los gatos parasitados fue de  $11,5 \pm 14,8$ , siendo menor en casos importados ( $7,0 \pm 7,1$ ). Esta cifra, a pesar de acercarse bastante a la media de la población canina de la misma zona: 9,2 (DS: 16,7), fue mayor en comparación con otros estudios realizados en gatos. De hecho, Motta *et al* (2014) describieron solo un gato que albergaba más de 10 vermes oculares en el mismo ojo y Maia *et al.* (2016) describieron que el número de vermes por gato oscilaba entre 1 y 14 ( $4,3 \pm 6,5$ ). En perros parasitados, el número medio de parásitos estuvo en línea con el de otros estudios: 8,08 (DS 9,49) (Maia *et al.*, 2016).

Un número tan elevado de nematodos, como hemos comentado anteriormente, puede estar relacionado con la endemicidad de muchas regiones españolas, porque un mayor porcentaje de animales infectados se corresponde con una mayor presencia de

moscas infectadas y, en consecuencia, cargas parasitarias más altas. Es importante destacar que la gran mayoría de los gatos (98%) vivían en el exterior, en una zona rural caracterizada por presentar una vegetación principalmente representada por la riqueza de robles y especies de vida silvestre, que representa el ambiente idóneo para que el parásito y su vector completen el ciclo biológico.

### **6.2.3. Papel que desempeñan los perros y los gatos en la epidemiología de la infección por *Thelazia callipaeda***

Nuestros resultados demuestran la endemidad de la infección por *T. callipaeda* en algunas regiones de España, revelando altas prevalencias en perros tanto en áreas endémicas iniciales como en otras detectadas recientemente, y una difusión cada vez mayor en la población felina. En consecuencia, es de destacar la propagación del parásito en España durante la última década.

Según la literatura, la thelaziosis ocular se percibe con mayor frecuencia como una patología canina: los perros son los principales hospedadores de este nematodo y se han considerado centinelas en la propagación de la infección por *T. callipaeda* (Otranto y Deplazes, 2019). Tanto la prevalencia registrada como el número de casos y su difusión en Europa son superiores en esta población. Asimismo, los gatos son hospedadores adecuados para la infección por *T. callipaeda* (Otranto *et al.*, 2005c) aunque su papel en la circulación del parásito parece ser aparentemente menor que el del perro. El escaso número de casos en gatos, así como su baja prevalencia, se puede explicar por los intensos hábitos de aseo de los mismos (Motta *et al.*, 2014). Además, los gatos son conocidos por tener hábitos nocturnos, hecho que podría reducir la exposición de esta especie al vector, cuya actividad está asociada con las horas diurnas. Por otro lado, parece que la tasa de prevalencia de la infección en gatos podría subestimarse (aún más que en la especie canina) porque una inspección ocular en profundidad, y/o el levantamiento del tercer párpado en gatos requiere, en la mayoría de los casos, una sedación previa (Otranto *et al.*, 2003a; Malacrida *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2014).

La población felina podría actuar como reservorio secundario del parásito en aquellas zonas donde la presencia de *Dirofilaria immitis* induce a los dueños de perros a utilizar fármacos preventivos, a menudo muy eficaces también frente a *T. callipaeda*

(Tosco *et al.*, 2010). En Europa, cada vez más se está promoviendo un manejo adecuado de los parásitos, especialmente en vista de su potencial zoonótico (es decir, *Toxocara canis* o *Dirofilaria immitis*) y se recomienda el uso de nematocidas, como las lactonas macrocíclicas, para su tratamiento y profilaxis (por ejemplo, ver [www.esccap.es](http://www.esccap.es)). Aunque no todos los nematocidas son eficaces frente a la infección por *T. callipaeda*, las lactonas macrocíclicas son la primera línea para su tratamiento y prevención. Esta práctica, cada vez más extendida para el control de esta nematodosis, podría haber limitado indirectamente la propagación de la thelaziosis en algunas áreas.

En resumen, el candidato felino perfecto susceptible de padecer thelaziosis felina es un gato que vive principalmente en el exterior y donde también hay perros (que, como ya comentamos, se infectan con mayor frecuencia). En consecuencia, si bien aún no conocemos el papel que juegan los gatos en la propagación de esta nematodosis ocular, es recomendable, al igual que en el perro, incluir esta parasitosis en el diagnóstico diferencial de patologías oculares en zonas endémicas.

Aún queda mucho por profundizar en la epidemiología de la infección por *T. callipaeda*, pero la globalización, el cambio climático, los movimientos de animales y la naturaleza autóctona y endémica del vector son factores que contribuyen a la rápida propagación y establecimiento de esta parasitosis, como también ha sido discutido por otros autores (Miró *et al.*, 2011; Graham-Brown *et al.*, 2017; Papadopoulos *et al.*, 2017 y Hodžić *et al.*, 2019). Además, nuestros resultados también sugieren que los casos en España y posiblemente en otros países europeos, probablemente estén infradiagnosticados y/o infrarregistrados. Es importante promover el conocimiento de esta parasitosis, ampliamente desconocida entre los profesionales veterinarios. El papel de la educación sanitaria (por parte de los propietarios, veterinarios, médicos de atención primaria, autoridades sanitarias, etc.) bajo un enfoque de “*One Health*” es esencial para el manejo de esta enfermedad zoonótica en la que se han descrito casos humanos esporádicos en Europa, aunque en Asia la thelaziosis humana en zonas rurales está más ampliamente extendida, llegando a representar un problema relevante de Salud Pública (Liu *et al.*, 2020).

### 6.3. Medidas terapéuticas y profilácticas de la thelaziosis canina y felina

#### 6.3.1. Clasificación clínica de la thelaziosis canina y felina

Numerosos autores han relacionado anteriormente la carga parasitaria con la gravedad de los signos clínicos (Otranto y Traversa, 2005; Shen *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2010; Dacal *et al.*, 2011) aunque algunos no describen esta asociación (Miró *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2012; González Jiménez *et al.*, 2013; Hodžić *et al.*, 2014).

En nuestro trabajo, clasificamos los pacientes en cuatro estadios clínicos que ayudan a caracterizar la infección por *T. callipaeda* en la especie canina (**Tabla XI**, apartado 4.2.). Estas lesiones se deben a la acción mecánica de las estriaciones transversales de la cutícula externa de los nematodos sobre el epitelio conjuntival y corneal (Otranto *et al.*, 2003a; Taylor *et al.*, 2010). El signo ocular observado con mayor frecuencia fue la infección de estadio 2 (desde conjuntivitis leve a conjuntivitis folicular crónica) (54,7%), seguido del estadio 1 (sin signos oculares) (37,1%). Tan solo el 5,8% de los animales estudiados (n=547) se consideraron de estadio 3, mostrando signos más graves de infección (conjuntivitis folicular complicada con marcada hiperplasia del tejido linfoide del tercer párpado) y un 2,3% un estadio 4 (conjuntivitis folicular crónica con posible presencia de úlcera corneal). De igual forma, Malacrida *et al.* (2008) describieron la presencia de conjuntivitis en un 81,4% de los perros diagnosticados en Suiza y Maia *et al.* (2016) en un 45,5% de los perros diagnosticados en Portugal.

En cuanto a la especie felina, clasificamos los pacientes en tres estadios clínicos (**Tabla XII**, apartado 4.2.). El estadio observado con mayor frecuencia fue el estadio 2 (conjuntivitis leve) (59,2%), seguido del estadio 1 (ausencia de signos oculares) (29,6%) y el estadio 3 (conjuntivitis complicada) (11,4%). Estos resultados están en concordancia con un estudio previo realizado en 17 gatos procedentes de Suiza (Motta *et al.*, 2014), el estudio con mayor número de gatos llevado a cabo hasta la fecha. Además, en nuestros resultados, la gravedad de los signos clínicos de nuevo demostró estar relacionada con un número mayor de parásitos, tal y como observamos en la población canina.

Se ha observado que la gravedad de los signos clínicos depende de la antigüedad de la infección. Como hemos comentado a lo largo de esta memoria, es muy difícil saber exactamente cuando un animal ha adquirido la infección y es altamente probable que, al

principio, un animal no presente signos clínicos, pero al cabo de un tiempo la persistencia de los parásitos en el ojo puede generar un cuadro cada vez más grave. De hecho, el porcentaje de perros que presentaron signos oculares (63%) fue considerablemente más alto que en estudios anteriores (15,4%) (Miró *et al.*, 2011). Además, como en otras infecciones, puede haber animales más susceptibles que otros, pudiéndose relacionar con otros factores de riesgo, como los ambientales (fuente de agua y alimento, estado socioeconómico de la familia en la que vive el animal) y/o factores genéticos (Taylor *et al.*, 2010).

### 6.3.2. Tratamiento y prevención de la thelaziosis canina

En los últimos años, debido a la relevancia que ha adquirido la thelaziosis canina, se han realizado varios estudios sobre su control, evaluando principalmente la eficacia terapéutica y/o profiláctica de diferentes moléculas frente a la infección por *T. callipaeda* (Rossi *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2013b; Lechat *et al.*, 2015; Otranto *et al.*, 2016).

En este trabajo, realizamos el primer ensayo en el que se compara la eficacia terapéutica y profiláctica de cuatro formulaciones antiparasitarias utilizadas en la especie canina:

Grupo A: Milbemicina oxima 12,5 mg + praziquantel 125 mg (vía oral)

Grupo B: Moxidectina 10 g (vía subcutánea)

Grupo C: Moxidectina 2,5 mg/ml + imidacloprid 10 mg/ml (*spot-on*)

Grupo D: Ivermectina 10 mg/ml diluida en propilenglicol (instilación ocular)

#### 6.3.2.1. Eficacia terapéutica

Todos los principios activos demostraron ser eficaces para el tratamiento de perros con infección natural por *T. callipaeda* (**Tablas 3 y 5** de la publicación 5.4.), pero la moxidectina (Grupo B) y la combinación de moxidectina con imidacloprid (Grupo C) mostraron una eficacia mayor tanto en el tratamiento como en la prevención de la infección. El principio activo común de estos grupos fue la moxidectina. La eficacia de esta molécula para tratar la thelaziosis canina ha sido previamente demostrada (Lia *et al.*, 2004; Bianciardi y Otranto, 2005; Rossi *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2013b; Otranto *et*

*al.*, 2016) y, como se ha comentado en la sección 2.6.1.2. varios productos que contienen este principio activo ya tienen esta indicación aceptada por la AEMPS (Agencia Europea de Medicamentos y Productos Sanitarios) para el tratamiento de la thelaziosis canina.

En la presente investigación, comparamos dos formulaciones comerciales que contienen moxidectina (inyectable y *spot-on*). Los valores de eficacia registrados en los perros tratados con moxidectina inyectable fueron 86%, 98% y 100% después de 14, 30 y 60 días del tratamiento, respectivamente. En estudios similares, se describió que todos los perros fueron negativos a la infección por *T. callipaeda* 8 días (Rossi *et al.*, 2007) o 28 días después del tratamiento con moxidectina (Montoya *et al.*, 2013b). Los porcentajes de eficacia en los perros tratados con moxidectina *spot-on* fueron 90,9% y 100% 14 y 30 días después del tratamiento, respectivamente. Estas proporciones están en línea con las registradas por otros autores que describen eficacias de un 90,5% y 95,2% a los 5 y 9 días después del tratamiento, respectivamente (Bianciardi y Otranto, 2005). Asimismo, en otro estudio, este mismo tratamiento registró una eficacia del 100% a los 7, 14, 28 y 35 días después de su administración (Otranto *et al.*, 2016).

Cabe mencionar que la tolerancia de la moxidectina se considera óptima incluso en perros sensibles a las avermectinas, a 10, 20 y 30 veces la dosis recomendada por el fabricante (Paul *et al.*, 2000).

Algunos autores abogan por el uso de gotas oculares de moxidectina al 1% para tratar la thelaziosis en perros, ya que la instilación local es más directa y requiere menos cantidad de producto (Lia *et al.*, 2004). Las gotas oculares a base de moxidectina tienen capacidad antihelmíntica y protegen de forma completa (100% de eficacia) después de 10 min, 24 h, 48 h, 72 h y 10 días, aunque esta capacidad no persiste a lo largo del tiempo (Lia *et al.*, 2004). En un ensayo realizado previamente por nuestro grupo de investigación, los resultados en perros tratados con colirio a base de moxidectina (78,6% de eficacia 28 días después del tratamiento) fueron mejores que los observados en perros tratados con colirio de ivermectina (68,8% de eficacia 28 días después del tratamiento). Sin embargo, en el mismo estudio, la eficacia profiláctica de la ivermectina fue mayor que la mostrada por la moxidectina en instilación ocular (Montoya *et al.*, 2013b). En base a estos hallazgos previos, incluimos en este trabajo una formulación ocular a base de ivermectina y propilenglicol (6 µg) en 43 perros. La administración subcutánea de 200 µg/kg de ivermectina había demostrado ser eficaz en el tratamiento de la thelaziosis canina (Rossi

y Peruccio, 1989; Pimenta *et al.*, 2013; Diakou *et al.*, 2015), pero no se había demostrado su eficacia en la prevención de la thelaziosis canina (Fudge *et al.*, 2007). Además, la ivermectina inyectable puede provocar efectos adversos no deseados en algunos animales, por lo que esta vía de administración no se recomienda en perros, por no estar registrada en la AEMPS para su uso en perros por esta vía. En consecuencia, en este estudio, se valoró la seguridad y la eficacia de una formulación de ivermectina en gotas oculares. Cabe destacar que se registraron reacciones adversas como prurito, irritación y enrojecimiento en 15 de 43 (34,9%) perros en este grupo de tratamiento y en 12 de 32 (37,5%) perros en el grupo de profilaxis. De acuerdo con estos hallazgos, no se recomienda su uso en el perro.

Otros autores han descrito que las formulaciones a base de milbemicina oxima sola o en combinación con otros principios activos son eficaces para el tratamiento de la infección por *T. callipaeda* (Ferroglio *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2016). En el presente estudio, los valores de eficacia de una formulación comercial de milbemicina fueron de 70,4%, 89,5% y 96,4% después de 7, 30 y 60 días de tratamiento, respectivamente. Estos resultados concuerdan con otros recogidos en la literatura (Ferroglio *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2016), donde se describen eficacias de entre un 57,4% y un 87,3% después de siete días de tratamiento (Ferroglio *et al.*, 2008; Otranto *et al.*, 2016) y de entre un 90,9% y un 98,2% después de catorce días (Ferroglio *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2012).

Además de analizar la eficacia terapéutica de los cuatro tratamientos propuestos, en el presente trabajo, valoramos la evolución de las alteraciones oculares a lo largo del estudio. Se observó una mejoría clínica significativa a lo largo de las visitas y principalmente entre los 7 y los 30 días después del tratamiento. Otros autores han observado una mejoría de los signos oculares después de la aplicación del tratamiento y, en consecuencia, de la reducción de la carga parasitaria (Rossi y Peruccio, 1989; Lia *et al.*, 2004; Otranto *et al.*, 2016). Con un tratamiento a base de moxidectina en gotas oculares, los signos clínicos remitieron parcialmente después de 72 horas de la aplicación del tratamiento, y la mejoría completa se observó a los 10 días post-tratamiento (Lia *et al.*, 2004). Otros autores observaron que con un tratamiento a base de milbemicina oral, se obtuvo una mejoría significativa de la conjuntivitis 28 días después del tratamiento (Otranto *et al.*, 2016). Por último, se describe la resolución completa de los cuadros de

conjuntivitis cuatro semanas después de una inyección subcutánea a base de ivermectina, siendo necesario más tiempo para la curación de los estadios de conjuntivitis complicada (Rossi y Peruccio, 1989).

### 6.3.2.2. Eficacia profiláctica

En nuestro estudio de profilaxis, solo 12 de 133 (9%) perros se infectaron durante el año que duró el estudio. Nuevamente, las formulaciones a base de moxidectina demostraron ser más eficaces para prevenir la thelaziosis (100% la moxidectina inyectable y 93,5% la moxidectina *spot-on*) en comparación con las gotas de ivermectina (87,5%) o los comprimidos a base de milbemicina oxima en combinación con praziquantel (83,3%). Los mejores resultados se obtuvieron en el grupo tratado con moxidectina inyectable en el que ningún perro se infectó a lo largo del año de estudio.

A día de hoy, sólo se han realizado seis ensayos para evaluar el uso profiláctico de fármacos frente a la infección por *T. callipaeda* (Fudge *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2007; Ferroglio *et al.*, 2008; Montoya *et al.*, 2013b; Lechat *et al.*, 2015; Lebon *et al.*, 2019) (**Tabla IX** del apartado 2.6.2.1. de profilaxis). Una sola dosis por vía subcutánea de moxidectina ya había demostrado ser 100% eficaz en el tratamiento y prevención de la infección (Rossi *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2013b). En ambos estudios, se describe que los perros permanecieron negativos durante al menos 6 meses, pero en el estudio realizado por Montoya *et al.* (2013) al final del año de estudio, todos los perros volvieron a estar infectados.

En el caso de la ivermectina, se estudió en una formulación oral (Fudge *et al.*, 2007) y en pomada ocular (Montoya *et al.*, 2013b), siendo la primera vez que se evalúa una formulación ocular. Como se ha expuesto anteriormente, en el estudio llevado a cabo por Fudge *et al.* (2007), no se demostró la eficacia profiláctica de esta molécula frente a la thelaziosis. Por otro lado, Montoya *et al.* (2003) señalaron una eficacia profiláctica de entre el 75 y el 100% al final del año de tratamiento.

Estudios similares han evaluado la eficacia profiláctica de la milbemicina oxima, registrando mejores resultados que los obtenidos en nuestro estudio. De hecho, Ferroglio *et al.* (2008) describieron que solo uno de los 30 perros incluidos (3%) se infectó durante el ensayo; y Lebon *et al.* (2019) reconocieron una eficacia del 100% en la prevención de la thelaziosis canina en 37 perros tratados con esta molécula.

Todos los perros que se reinfectaron durante el periodo de estudio, fueron diagnosticados durante la época de actividad estacional del vector (de abril a noviembre). De hecho, la mayoría de las infecciones se detectaron entre julio y noviembre (10/12, 83,3%). La presencia de formas parasitarias en algunas visitas de revisión en el marco de este estudio (tanto en los estudios terapéuticos como profilácticos) indica que el tratamiento mensual no evita el contacto del vector *P. variegata* con los perros, pero sí previene infecciones más graves, parasitosis elevadas, y limita la reinfección. De hecho, en la mayoría de las infecciones se recogieron estadios larvarios (L3), y solo en cuatro casos, se detectaron vermes adultos. Además, los perros que resultaron positivos durante el estudio de profilaxis finalmente negativizaron a lo largo del período de estudio, lo cual demuestra que el uso de medidas profilácticas permite un control de esta parasitosis en caso de reinfecciones durante las épocas de riesgo.

Queda patente que las lactonas macrocíclicas (como la moxidectina y la milbemicina oxima) no tienen efecto sobre el vector (*P. variegata*), de manera que la eficacia profiláctica de estos fármacos se atribuye a su acción frente a las larvas de *T. callipaeda* poco después de que éstas sean depositadas en las secreciones lacrimales por una mosca infectada (Wolstenholme *et al.*, 2016).

Algunos autores intentaron valorar el posible efecto repelente para minimizar la exposición de los perros al vector mediante el uso de un collar insecticida a base de 10% imidacloprid y 4,5% flumetrina, pero la incidencia final de la infección que se registró en los perros con collares y en los del grupo control fue similar, aportando evidencias sobre su falta de eficacia (Lechat *et al.*, 2015). Mientras no se desarrollen moléculas con eficacia repelente probada y dado que esta infección es transmitida por un vector artrópodo, el contacto entre los animales y este vector debería evitarse en la medida de lo posible. Sería recomendable utilizar mosquiteras en los lugares donde se alojan los perros y evitar pasear a los perros por zonas con mucha densidad del vector.

### **6.3.3. Tratamiento y prevención de la thelaziosis felina**

Si los estudios sobre el control de la thelaziosis canina son todavía escasos, esto es aún más acusado en el caso de la thelaziosis felina. En esta Tesis Doctoral, se ha evaluado la eficacia terapéutica de dos formulaciones (ivermectina y moxidectina) y la

eficacia profiláctica de la moxidectina en gatos con infección natural por *T. callipaeda*, procedentes de dos zonas endémicas en España.

### 6.3.3.1. Eficacia terapéutica

Ambos productos resultaron eficaces para el tratamiento de los gatos infectados. Las tasas de eficacia variaron desde un mínimo del 91,7% el día 28 después del tratamiento en La Vera, Cáceres, donde los animales fueron tratados con un colirio a base de ivermectina, y un máximo del 100% registrado en Miraflores de la Sierra, Madrid, el día 14 (V2), donde los animales recibieron un tratamiento con una formulación tópica a base de moxidectina e imidacloprid. Nuevamente en este trabajo, tal y como se ha descrito en la especie canina, la moxidectina ha resultado ser la mejor opción.

Recientemente, en algunos productos antiparasitarios a base de moxidectina, al igual que en perros, también se ha añadido en su ficha técnica la indicación para su uso en el tratamiento de la thelaziosis felina.

Hasta el momento, hay muy pocos estudios disponibles realizados en gatos, pero recientemente se evaluó la eficacia terapéutica de una combinación de moxidectina al 1,0% (p/v) e imidacloprid al 10% (p/v) *spot-on* para tratar 30 gatos en Italia (Otranto *et al.*, 2019). La eficacia fue similar a la obtenida en este ensayo, siendo del 93,3% el día 14 y del 100% el día 28.

En el presente trabajo también obtuvimos resultados sobre la eficacia de una formulación con un colirio a base de ivermectina 10 mg/ml diluido al 10% en propilenglicol en 12 gatos con infección natural en España. De los 12 gatos incluidos en el estudio, el 93,3% estaban libres de parásitos 28 días después del tratamiento. Anteriormente se había demostrado la eficacia del uso de la ivermectina para el tratamiento de la thelaziosis canina (Rossi y Peruccio, 1989; Fudge *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2013b; Pimenta *et al.*, 2013; Diakou *et al.*, 2015). Sin embargo, en nuestro trabajo en la población canina, se ha observado que la ivermectina en gotas puede provocar reacciones adversas como prurito, irritación, enrojecimiento en algunos animales, por lo que su uso debe restringirse, si es posible. Contrariamente a lo observado en la especie canina, en este estudio, los gatos no mostraron reacciones adversas frente a esta formulación.

De igual forma, Motta *et al.* (2012) habían estudiado anteriormente la eficacia de una formulación oral de milbemicina oxima y praziquantel en 31 gatos en Italia y Suiza. De los 31 gatos incluidos en el estudio, el 53,3% y el 73,3% de los animales tratados no presentaron infección por *T. callipaeda* a los 7 y 14 días después del tratamiento. La eficacia de esta formulación también fue evaluada por nuestro grupo de investigación en un solo caso de un gato procedente de Ourense que fue atendido en la consulta de enfermedades infecciosas y parasitarias del Hospital Clínico Veterinario de la UCM y diagnosticado de la infección por *T. callipaeda*. El gato fue tratado con una combinación de 2 mg/kg de milbemicina oxima y praziquantel. Dos semanas después del tratamiento, se demostró la ausencia completa de parásitos (Montoya *et al.*, 2013a).

Además de analizar la eficacia terapéutica de los tratamientos propuestos, en este trabajo, se valoró la evolución de las alteraciones oculares a lo largo del estudio. Se observó una mejoría en estas alteraciones a lo largo de las visitas realizadas en el grupo de animales tratados con moxidectina (**Fig. 7b**, publicación 5.5.). Aunque el 57,1% de los gatos no presentaba signos oculares cuando se realizó su diagnóstico, tres de ellos (47,9%) presentaban un grado 2 de la infección (conjuntivitis, descarga ocular, prurito, y blefaritis). Los signos oculares mejoraron en las diferentes visitas, lo que confirma la relación entre la presencia de parásitos y la gravedad de los signos oculares, tal y como fue observado en la especie canina y descrito por otros autores en la misma especie felina (Otranto *et al.*, 2019). En efecto, el 85,7% de los gatos no presentaba signos clínicos 28 días después del tratamiento y el 100% el día 56.

#### **6.3.3.2. Eficacia profiláctica**

Con el presente estudio, por un lado, aportamos resultados sobre el uso de un colirio a base de ivermectina frente a la thelaziosis felina, y por otro, confirmamos la eficacia de una formulación a base de moxidectina, proporcionando nueva información sobre su eficacia profiláctica en gatos. De hecho, este es el primer estudio de eficacia profiláctica a lo largo de un año realizado en la especie felina en una zona endémica. En este trabajo ninguno de los gatos incluidos en el estudio de profilaxis adquirió la infección por *T. callipaeda*, demostrando que la aplicación de estas medidas profilácticas en la especie felina protege de la infección a los animales que vivan en zonas endémicas.

Consideramos necesaria la realización de estudios con un mayor tamaño muestral para evaluar la eficacia terapéutica y sobre todo profiláctica frente a la infección por *T. callipaeda* en la población felina.

### **6.3.3. Consideraciones generales sobre el tratamiento y la prevención de la thelaziosis canina y felina**

Curiosamente, en el presente ensayo, ningún animal había sido tratado con una molécula eficaz frente a *T. callipaeda* (siendo precisamente este uno de los requisitos del estudio). Por tanto, informar a los veterinarios sobre la endemidad de *T. callipaeda* en España, de su presencia también en la población felina y de su distribución actual podría ayudar en la prevención de esta parasitosis. Esta falta de conocimiento, que es incluso más acusado en gatos, perjudica en gran medida el desarrollo y la implementación de medidas preventivas y de control efectivas a nivel nacional y provincial (Otranto *et al.*, 2010).

En general, teniendo en cuenta que los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran que en las zonas endémicas la prevalencia de la infección puede alcanzar valores de hasta el 68% en la población canina y el 40% en la felina, el tratamiento regular de perros y gatos en riesgo es fundamental para el control de la infección y reducir así el impacto de esta zoonosis. La thelaziosis ocular es una zoonosis emergente cada vez más extendida y, por tanto, es recomendable realizar de forma rutinaria un examen oftalmológico exhaustivo para detectar infecciones subclínicas en carnívoros domésticos en zonas endémicas. Asimismo, el diagnóstico precoz y el tratamiento previenen las complicaciones asociadas por esta parasitosis, como dolor, incomodidad y/o cuadros clínicos más graves (Gajić *et al.*, 2014). Además, de esta manera, se puede evitar el uso innecesario de antibióticos cuando no hay colonización bacteriana secundaria (Fuentes *et al.*, 2012).

La ausencia de medidas profilácticas implementadas de manera eficiente en carnívoros puede ser crucial en el aumento de casos de thelaziosis (Motta *et al.*, 2012). Como se ha discutido anteriormente, el uso regular de moxidectina o milbemicina en áreas endémicas es muy recomendable (Lia *et al.*, 2004; Bianciardi y Otranto, 2005; Rossi *et al.*, 2007; Ferroglio *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2012; Lechat *et al.*, 2015; Otranto *et al.*,

2016, 2019; Lebon *et al.*, 2019). Se debe considerar el uso de tratamientos antihelmínticos mensuales en los programas de medicina preventiva de los animales que viven en zonas endémicas de la infección por *T. callipaeda* durante los meses en los que el riesgo es mayor, con el fin de eliminar los estadios larvarios poco después que las moscas los depositen, interrumpiendo así el ciclo de transmisión hospedador-parásito. Las medidas profilácticas destinadas a reducir la presión parasitaria en áreas endémicas son esenciales, ya que podrían ayudar a limitar su propagación a nuevas áreas en Europa y así limitar la dispersión de la infección por *T. callipaeda*. Por lo tanto, debido al aumento de casos en España y en Europa es necesario incluir en medicina veterinaria esta parasitosis en el diagnóstico diferencial de enfermedades que causan signos oculares, especialmente en animales que viven o han viajado a zonas endémicas. Una disminución de la presión parasitaria, a través de un correcto manejo de la infección, llevaría a una menor circulación de este parásito ocular y, en consecuencia, un menor índice de infección también en las especies silvestres, que, como ya se ha discutido, desarrollan un papel como reservorios de esta parasitosis en España y en Europa (Otranto *et al.*, 2015; López-Beceiro *et al.*, 2017; Otranto y Deplazes, 2019).

Es igualmente digno de mención que la creciente concienciación entre veterinarios, parasitólogos y oftalmólogos sobre la importancia de la thelaziosis ha contribuido seguramente a un mayor número de denuncias de casos en Europa (Otranto *et al.*, 2013; do Vale *et al.*, 2019, 2020), pero también indica que la infección es emergente en muchas áreas del continente. Por otro lado, queda mucho camino por recorrer debido al gran desconocimiento de una parte del colectivo sanitario de esta parasitosis y, en consecuencia, a la falta de implementación de medidas preventivas en zonas endémicas.

Finalmente, es esencial desarrollar políticas de vigilancia para los animales que viajan a zonas endémicas, con el fin de minimizar la distribución del parásito hacia nuevas áreas donde esté presente el vector competente, *P. variegata* (Otranto *et al.*, 2010; Colwell *et al.*, 2011; Graham-Brown *et al.*, 2017).

## **7. CONCLUSIONES**

---



## 7. CONCLUSIONES

**Primera.** Se confirma que el macho de la mosca drosófila *Phortica variegata*, único vector de *Thelazia callipaeda* descrito en Europa, lo es también en España y, en consecuencia, la difusión de este nematodo parásito está estrechamente vinculada a la de su vector artrópodo.

**Segunda.** *Phortica variegata* está presente en varias zonas de España y su presencia está estrechamente relacionada con las variables climáticas y ambientales, en especial la temperatura y los pisos bioclimáticos supra- y mesomediterráneo, poniendo de manifiesto la importancia de conocer estas variables medioambientales para el estudio de su ciclo biológico. La época de actividad de *P. variegata* en España se sitúa entre abril y noviembre, alcanzando su pico máximo entre julio y septiembre, dependiendo de las condiciones bioclimáticas anuales. La temperatura es una variable climática determinante en la dinámica estacional de los machos de *P. variegata*, lo que significa que está directamente asociada con el aumento de la densidad de *P. variegata*, el acortamiento de las fases de su ciclo de vida y por lo tanto con el incremento del riesgo de transmisión de *Thelazia callipaeda*.

**Tercera.** La infección por *Thelazia callipaeda* presenta una amplia distribución en carnívoros domésticos en España, registrándose casos autóctonos en la población canina en un número elevado de provincias a lo largo de toda la geografía española. Las prevalencias más altas se registran en zonas geográficas con mayor recorrido endémico (La Vera), describiéndose prevalencias menores en zonas de reciente endemidad (El Escorial y Miraflores de la Sierra).

**Cuarta.** La infección por *Thelazia callipaeda* es más prevalente en el perro que en el gato, registrándose prevalencias más altas y con un mayor número de casos clínicos denunciados; lo que confirma el papel del perro como reservorio principal de esta parasitosis. No obstante, queda patente que el gato es un hospedador adecuado, poniéndose así de manifiesto la necesidad de incluir la infección por *T. callipaeda* en el diagnóstico diferencial de los problemas oculares en ambas especies.

**Quinta.** Existe una correlación positiva entre la carga parasitaria y la gravedad de los signos oculares. La clasificación clínica de los animales parasitados por *Thelazia callipaeda* puede ser útil para contribuir a un mejor manejo clínico de esta parasitosis ocular.

**Y sexta.** La moxidectina se considera el principio activo de primera elección tanto en el tratamiento como en la prevención de la infección natural por *Thelazia callipaeda* en las especies canina y felina. La milbemicina oxima también surge como una buena opción en la especie canina. Por el contrario, no se recomienda el uso de la ivermectina en gotas oculares por la elevada probabilidad de causar reacciones adversas. Resulta fundamental el tratamiento de los animales infectados y la implementación de medidas profilácticas para controlar las altas prevalencias presentes en España y reducir los riesgos tanto para la salud pública como animal.

## 7. CONCLUSIONS

**First.** The male of the drosophila *Phortica variegata*, the only vector of *Thelazia callipaeda* described in Europe, is also the only confirmed vector in Spain. Consequently, the spread of this nematode parasite is closely related to that of its arthropod vector.

**Second.** *Phortica variegata* is present in several areas of Spain, and its presence is directly associated to climatic and environmental variables, especially temperature and supra- and mesomediterranean bioclimate, highlighting the importance of knowing these climate-related variables for the study of its biological cycle. The activity period of *P. variegata* in Spain ranges between April to November, reaching its maximum activity between July and September, depending on the annual bioclimatic conditions. Temperature is a decisive climatic variable in the seasonal dynamics of *P. variegata* males, which means that it has a direct influence on the increase in the density of *P. variegata* together with the shortening of the phases of its life cycle, and therefore on the increased risk of transmission of *Thelazia callipaeda*.

**Third.** *Thelazia callipaeda* infection has a wide distribution in domestic carnivores in Spain, with autochthonous cases in the canine population in a large number of provinces throughout the entire Spanish territory. The highest prevalences are recorded in the geographical areas with known high endemicity (La Vera), while lower prevalences are reported in areas of recent endemicity (El Escorial and Miraflores de la Sierra).

**Fourth.** *Thelazia callipaeda* infection is more prevalent in dogs than cats, and more clinical cases have been reported in this species, which confirms the dog's role as the main reservoir of this parasitosis. However, it is clear that the cat is a suitable host, highlighting the need to include *T. callipaeda* infection in the differential diagnosis of eye problems in both species.

**Fifth.** There is a positive correlation between the number of parasites and the severity of the ocular signs. The clinical staging of animals parasitized by *Thelazia callipaeda* may be helpful to the clinical management of this ocular parasitosis.

**Y sixth.** Moxidectin is considered the first-line drug for both the treatment and the prevention of *Thelazia callipaeda* infection in the canine and feline species. Milbemycin oxime is also a good option in the canine species. On the contrary, the use of ivermectin as eye drops is not recommended due to the high probability of adverse reactions. The treatment of infected animals and the implementation of prophylactic measures are essential to control the high prevalences in Spain and reduce the risks for both public and animal health.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

---



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, H. R. (2001). *Farmacología y terapéutica veterinaria*, 2ªed. Zaragoza, España, ed. Acribia.
- Agapito, D., Aziz, N-A. A., Wang, T., Morgan, E.R., Wright, I. (2018). Subconjunctival *Dirofilaria repens* infection in a dog resident in the UK. *J. Small Anim. Pract*, 59, 50–52. <https://doi.org/10.1111/jsap.12795>.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (2021). Advocate. Disponible en: [https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ft/EU%402%4003%40039%40007/FT\\_EU-2-03-039-007.pdf](https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/ft/EU%402%4003%40039%40007/FT_EU-2-03-039-007.pdf). (Fecha de acceso: 29/06/2021).
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (2020). *Milbactor Comprimidos*. Disponible en: [https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/p/3159+ESP/P\\_3159+ESP.pdf](https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/p/3159+ESP/P_3159+ESP.pdf). (Fecha de acceso: 20/05/2020).
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (2016). *Milbemax Prospecto Milbemax Comprimidos*. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/Documentos/2017/3/9/112391.pdf>. (Fecha de acceso: 20/05/2020).
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (2019). *Milpro Comprimidos Recubiertos Con Pelicula*. Disponible en: [https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/p/3095+ESP/P\\_3095+ESP.pdf](https://cimavet.aemps.es/cimavet/pdfs/es/p/3095+ESP/P_3095+ESP.pdf). (Fecha de acceso: 20/05/2020).
- Agencia Estatal de Meteorología (AEMET). (s.f.). *Valores climatológicos normales. Cáceres*. Disponible en: <https://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos?l=3469A&k=ext>. (Fecha de acceso: 06/05/2020).
- Agencia Estatal de Meteorología (AEMET). (s.f.). *Valores climatológicos normales. Ourense*. Disponible en: <http://www.aemet.es/en/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos?l=1690A&k=gal>. (Fecha de acceso: 06/05/2020).
- Akhanda, A.H., Akonjee, A.R., Hossain, M.M., Rahman, M.A., Mishu, F.A., Hasan, M.F., Akhanda, T.H. (2013). *Thelazia callipaeda* infestation in Bangladesh: a case report. *Mymensingh Med. J. MMJ*, 22, 581–584.
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*, 2nd ed. Wallingford, Oxon, UK, ed. CABI.
- Arias, M.S., Varela-López O., González-Cantalapiedra A., Cazapal-Monteiro C., Gómez D., Paz-Silva A., Rosamanta A., Sánchez-Andrade R. (2013). Primer hallazgo de thelaziosis canina autóctona en Galicia. En: *XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA)*, Gran Canaria, España.
- Arme, T.M., Lia, R.P., Annoscia, G., Casalino, E., Pombi, M., Otranto, D., (2019). Survival of *Phortica variegata* experimentally and naturally infected with *Thelazia callipaeda*. *Med. Vet. Entomol*, 34(2), 201-206. <https://doi.org/10.1111/mve.12419>.

- Ashburner, M., Golic, K.G., Hawley, R.S. (2005). *Drosophila: a laboratory handbook*, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Attardo, G.M., Hansen, I.A., Raikhel, A.S. (2005). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. *Insect Biochem. Mol. Biol., Genetic manipulation of insects*, 35, 661–675. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.02.013>
- Bächli, G., Vilela, C. R., Andersson Escher, S., Saura, A., (2004). *The Drosophilidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark*. Fauna Entomologica Scandinavica. 39, 1–362. ed. Brill, Leiden.
- Bänziger, H., Boongird, S., Sukumalanand, P., Bänziger, S. (2009). Bees (Hymenoptera: Apidae) that drink human tears. *J. Kans. Entomol. Soc*, 82, 135–150.
- Bello, A., Hernández L., Checa R., Dado D., Montoya A., Benito M., Vázquez M., Villagrasa M., Miró G. (2012). Situación epidemiológica actual de la thelaziosis ocular canina en España. En: *XXIX Congreso Annual de AMVAC*, Madrid, España.
- Beugnet, F., Marié, J.-L. (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.028>.
- Bhaibulaya, M., Prasertsilpa, S., Vajrasthira, S. (1970). *Thelazia callipaeda* Railliet and Henry, 1910, in man and dog in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 19, 476–479.
- Bianciardi, P., Otranto, D. (2005). Treatment of dog thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) using a topical formulation of imidacloprid 10% and moxidectin 2.5%. *Vet. Parasitol*, 129, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.020>.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B. (1998). Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA for nematode systematics. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1719–1727. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025898>.
- Bradbury, R.S., Breen, K.V., Bonura, E.M., Hoyt, J.W., Bishop, H.S. (2018). Case Report: Conjunctival Infestation with *Thelazia gulosa*: A Novel Agent of Human Thelaziasis in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 98, 1171–1174. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0870>.
- Bradbury, R.S., Gustafson, D.T., Sapp, S.G.H., Fox, M., de Almeida, M., Boyce, M., Iwen, P., Herrera, V., Ndubuisi, M., Bishop, H.S. (2020). A Second Case of Human Conjunctival Infestation with *Thelazia gulosa* and a Review of *T. gulosa* in North America. *Clin. Infect. Dis*, 16; 70(3), 518-520 <https://doi.org/10.1093/cid/ciz469>.
- Brake, I., Baechli, G. (2008). *Drosophilidae (Diptera)*. World catalogue of insects, 9. Ed. Brill, 248-301. [https://doi.org/10.1163/9789004261037\\_001](https://doi.org/10.1163/9789004261037_001).
- Čabanová, V., Kocák, P., Víchová, B., Miterpáková, M. (2017). First autochthonous cases of canine thelaziosis in Slovakia: a new affected area in Central Europe. *Parasit. Vectors*, 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2128-2>.
- Čabanová, V., Miterpáková, M., Oravec, M., Hurníková, Z., Jerg, S., Nemčíková, G., Červenská, M.B. (2018). Nematode *Thelazia callipaeda* is spreading across Europe. The first survey of red foxes from Slovakia. *Acta Parasitol*, 63, 160–166. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0018>.

- Calero-Bernal, R., Otranto, D., Pérez-Martín, J.E., Serrano, F.J., Reina, D. (2013). First report of *Thelazia callipaeda* in wildlife from Spain. *J. Wildl. Dis*, 49, 458–460. <https://doi.org/10.7589/2012-10-268>.
- Calero-Bernal, R., Sánchez-Murillo, J.M., Alarcón-Elbal, P.M., Sánchez-Moro, J., Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2014). Resolution of canine ocular thelaziosis in avermectin-sensitive Border Collies from Spain. *Vet. Parasitol*, 200, 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.014>.
- Cantacessi, C., Traversa, D., Testini, G., Lia, R.P., Cafarchia, C., Máca, J., Otranto, D. (2008). Molecular identification of *Phortica variegata* and *Phortica semivirgo* (Drosophilidae, Steganinae) by PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I gene. *Parasitol. Res*, 103, 727–730. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1027-z>.
- Cao, H., Wang, X., Gao, J., Prigent, S.R., Watabe, H., Zhang, Y., Chen, H. (2011). Phylogeny of the African and Asian *Phortica* (Drosophilidae) deduced from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol*, 61, 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.08.002>
- Carithers, D., Miro, G. (2012). *Atlas de información al propietario parásitos. Parásitos*. 1ªed. Servet.
- Caron, Y., Premont, J., Losson, B., Grauwels, M. (2013). *Thelazia callipaeda* ocular infection in two dogs in Belgium. *J. Small Anim. Pract*, 54, 205–208. <https://doi.org/10.1111/jsap.12003>.
- Cervone, M., Bouhanna, L. (2018). Angiostrongylose oculaire chez un cavalier king charles. *Point Vét. Éd Expert Canin*, 49, 76–79.
- Chalghaf, B., Chemkhi, J., Mayala, B., Harrabi, M., Benie, G.B., Michael, E., Ben Salah, A. (2018). Ecological niche modeling predicting the potential distribution of *Leishmania* vectors in the Mediterranean basin: impact of climate change. *Parasit. Vectors*, 11, 461. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3019-x>.
- Chandler, P. (2014). *Phortica variegata* (Fallén) (Diptera, Drosophilidae) at Bushy Park, Middlesex and Windsor Forest, Berkshire. *Dipter. Dig*, 21, 149–150.
- Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Rupérez, C., Benito, M., Miró, G. (2012). Tratamiento de la thelaziosis canina. *Canis et Felis*, 119, 49–55.
- Checa, R., López-Beceiro, A.M., Montoya, A., Barrera, J.P., Ortega, N., Gálvez, R., Marino, V., González, J., Olmeda, Á.S., Fidalgo, L.E., Miró, G. (2018). *Babesia microti*-like piroplasm (syn. *Babesia vulpes*) infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in NW Spain (Galicia) and its relationship with *Ixodes hexagonus*. *Vet. Parasitol*. 252, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.011>
- Chermette, R., Guillot, J., Bussiéras, J. (2004). Canine ocular thelaziosis in Europe. *Vet. Rec*, 154, 248.
- Chirico, J. (1994). Prehibernating *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae)-an overwintering host for parasitic nematodes. *Vet. Parasitol*, 52, 279–284. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90119-8).
- Choi, W.Y., Youn, J.H., Nam, H.W., Kim, W.S., Kim, W.K., Park, S.Y., Oh, Y.W. (1989). Scanning electron microscopic observations of *Thelazia callipaeda* from

- human. *Kisaengchunghak Chapchi* 27(3), 217–223. <https://doi.org/10.3347/kjp.1989.27.3.217>.
- Ciuca, L., Meomartino, L., Piantedosi, D., Cortese, L., Cringoli, G., Rinaldi, L., Lamagna, B. (2019). Irreversible Ocular Lesions in a Dog with *Angiostrongylus vasorum* Infection. *Top. Companion Anim. Med.* 36, 4–8. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2019.05.001>.
- Clemons, L. (2009). *Phortica variegata* (Fallén, 1823) (Diptera, Drosophilidae) in Kent. *Dipter. Dig.* 16, 25.
- Colella, V., Kirkova, Z., Fok, É., Mihalca, A.D., Tasić-Otašević, S., Hodžić, A., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2016a). Increase in Eyeworm Infections in Eastern Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1513–1515. <https://doi.org/10.3201/eid2208.160792>.
- Colella, V., Lia, R.P., Premont, J., Gilmore, P., Cervone, M., Latrofa, M.S., D’Anna, N., Williams, D., Otranto, D. (2016b). *Angiostrongylus vasorum* in the eye: new case reports and a review of the literature. *Parasit. Vectors*, 9, 161. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1440-6>.
- Colwell, D.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2011). Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Vet. Parasitol. Special issue: Zoonoses in a Changing World*, 182, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.012>.
- Dacal, V., Vázquez, L., Pato, F.J., Francisco, I., Cazapal-Monteiro, C., Romasanta, A. (2011). Hallazgo de infección por nematodos del género *Thelazia* (Boso, 1819) en un perro de Salamanca (España). *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 70, 109–113.
- Dantas-Torres, F., Capelli, G., Giannelli, A., Ramos, R.A.N., Lia, R.P., Cantacessi, C., de Caprariis, D., De Tommasi, A.S., Latrofa, M.S., Lacasella, V., Tarallo, V.D., Di Paola, G., Quorollo, B., Breitschwerdt, E., Stanneck, D., Otranto, D. (2013). Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs. *Parasit. Vectors*, 6, 245. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-245>.
- Das, J.K., Das, D., Deshmukh, S., Gupta, K., Tomar, S.S., Borah, E. (2018). Live encysted *Thelazia callipaeda* presenting as a lump adjacent to the right lacrimal sac in a 42-year-old female: A rare case report. *Indian J. Ophthalmol.* 66, 1220–1223. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_317\\_18](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_317_18).
- Davey, R.B., Miller, J.A., George, J.E., Miller, R.J. (2005). Therapeutic and persistent efficacy of a single injection treatment of ivermectin and moxidectin against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on infested cattle. *Exp. Appl. Acarol.* 35, 117–129. <https://doi.org/10.1007/s10493-004-2046-9>.
- Davis, D.J., Lee, R.E. (2001). Intracellular freezing, viability, and composition of fat body cells from freeze-intolerant larvae of *Sarcophaga crassipalpis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 48, 199–205. <https://doi.org/10.1002/arch.1072>.
- De, N.V., Le, T.H., Chai, J.-Y., (2012). The First Human Case of *Thelazia callipaeda* Infection in Vietnam. *Korean J. Parasitol.* 50, 221–223. <https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.3.221>.
- Deltell, J.G., Calderón, S.R., Paz Vidal, M.I., de La Fuente Iglesias, M. (2019). A propósito de dos casos de thelaziosis ocular humana. *Rev. Esp. Quimioter.* 32, 286–287.

- Di Sacco, B., Ciocca, A., Sirtori, G. (1995). *Thelazia callipaeda* nel sacco congiuntivale di un gatto di Milano. *Veterinaria*, 4, 81–84.
- Diakou, A., Di Cesare, A., Tzimoulia, S., Tzimoulias, I., Traversa, D. (2015). *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae): first report in Greece and a case of canine infection. *Parasitol. Res*, 114, 2771–2775. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4457-4>.
- Diakou, A. (2017). *Thelazia callipaeda*: vigilance is the best course of action. *Vet. Rec*, 181, 344–345. <https://doi.org/10.1136/vr.j4454>.
- do Vale, B., Lopes, A.P., da Conceição Fontes, M., Silvestre, M., Cardoso, L., Coelho, A.C. (2019). Thelaziosis due to *Thelazia callipaeda* in Europe in the 21st century-A review. *Vet. Parasitol*, 275, 108957. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108957>.
- do Vale, B., Lopes, A.P., da Conceição Fontes, M., Silvestre, M., Cardoso, L., Coelho, A.C. (2020). Systematic review on infection and disease caused by *Thelazia callipaeda* in Europe: 2001-2020. *Parasite Paris Fr*, 27, 52. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020048>.
- Doezie, A.M., Lucius, R.W., Aldeen, W., Hale, D.V., Smith, D.R., Mamalis, N. (1996). *Thelazia californiensis* conjunctival infestation. *Ophthalmic Surg. Lasers*, 27, 716–719.
- Dolff, S., Kehrmann, J., Eisermann, P., Dalbah, S., Tappe, D., Rating, P. (2020). Case Report: *Thelazia callipaeda* Eye Infection: The First Human Case in Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 102, 350–351. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0483>.
- Doncaster, C.P., Macdonald, D.W. (1991). Ecology and Ranging Behaviour of Red Foxes in the City of Oxford. *Hystrix*, 3, 11-20.
- Dorchies, Ph., Chaudieu, G., Siméon, L.A., Cazalot, G., Cantacessi, C., Otranto, D. (2007). First reports of autochthonous eyeworm infection by *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs and cat from France. *Vet. Parasitol*, 149, 294–297. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.005>.
- Dryden, M.W., Denenberg, T.M., Bunch, S. (2000). Control of fleas on naturally infested dogs and cats and in private residences with topical spot applications of fipronil or imidacloprid. *Vet. Parasitol*, 93, 69–75. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00318-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00318-6).
- Dumitrache, M.O., Györke, A., Mircean, M., Benea, M., Mircean, V. (2018). Ocular thelaziosis due *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae) in Romania: first report in domestic cat and new geographical records of canine cases. *Parasitol. Res*, 117, 4037–4042. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6122-1>.
- Dumitrache, M.O., Ionică, A.M., Voinițchi, E., Chavdar, N., D'Amico, G. (2019). First report of canine ocular thelaziosis in the Republic of Moldova. *Parasit. Vectors*, 12, 505. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3758-3>.
- El-Dakhly, K., Abo El-Hadid, S., Shimizu, H., El-Nahass, S., Murai, A., Sakai, H., Yanai, T. (2012). Occurrence of *Thelazia callipaeda* and *Toxocara cati* in an imported European lynx (*Lynx lynx*) in Japan. *J. Zoo Wildl. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Zoo Vet*, 43, 632–635. <https://doi.org/10.1638/2011-0086R2.1>.

- Epe, C., Roesler, K., Schnieder, T., Stoye, M. (1999). Investigations into the prevention of neonatal *Ancylostoma caninum* infections in puppies by application of moxidectin to the bitch. *Zentralblatt Vet. B*, 46(6), 361–367. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.1999.00232.x>.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP). (2012). ESCCAP España. Disponible en: <http://www.esccap.es/> Fecha de acceso: 20/02/2020).
- Eser, M., Miman, Ö., Acar, A. (2018). *Thelazia callipaeda* (Railliet and Henry, 1910) Case in a Dog: First Record in Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*, 25(1), 129–132. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20487>.
- European Medicine Agency (EMA). (2020). *Advocate Eur. Med. Agency*. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/advocate> (Fecha de acceso: 20/05/2020).
- European Medicine Agency (EMA). (2020). *Nexgard Spectra Eur. Med. Agency*. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/nexgard-spectra> (Fecha de acceso: 20/05/2020).
- Evans, G.H., Rennie, T. (1910). Notes on some parasites in Burma. III. A few common parasites of elephants. *Jour Trop Vet Sci*, 5, 240–256.
- Falk, S. (2015). Surveys of *Phortica variegata* (Diptera: Drosophilidae) in 2014 with a compilation of other recent records. *Buglife - Invertebr. Conserv. Trust*.
- Farkas, R., Takács, N., Gyurkovszky, M., Henszelmann, N., Kisgergely, J., Balka, G., Solymosi, N., Vass, A. (2018). The first feline and new canine cases of *Thelazia callipaeda* (Spirurida: Thelaziidae) infection in Hungary. *Parasit. Vectors*, 11(1), 338. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2925-2>
- Faust, E.C. (1928). Studies on *Thelazia callipaeda* Railliet and Henry 1910. *J. Parasitol*, 15(2), 75–86.
- Ferroglio, E., Rossi, L., Tomio, E., Schenker, R., Bianciardi, P. (2008). Therapeutic and prophylactic efficacy of milbemycin oxime (interceptor) against *Thelazia callipaeda* in naturally exposed dogs. *Vet. Parasitol*, 154, 351–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.011>.
- Finkler, H., Gunther, I., Terkel, J. (2011). Behavioral differences between urban feeding groups of neutered and sexually intact free-roaming cats following a trap-neuter-return procedure. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 238, 1141–1149. <https://doi.org/10.2460/javma.238.9.1141>.
- Fudge, M., Jeong, S., McInturff, P. (2007). A clinical trial of ivermectin against eyeworms in German Shepherd military working dogs. *US Army Med. Dep. J*, 51–56.
- Fuentes, I., Montes, I., Saugar, J.M., Latrofa, S., Gárate, T., Otranto, D. (2012). Thelaziosis in Humans, a Zoonotic Infection, Spain, 2011. *Emerg. Infect. Dis*, 18, 2073–2075. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120472>
- Gajić, B., Bogunović, D., Stevanović, J., Kulišić, Z., Simeunović, P., StaniMiróvić, Z., (2014). Canine and feline thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Serbia. *Acta Vet. (Beogr.)*, 64(4), 447–455. <https://doi.org/10.2478/acve-2014-0042>.

- Gajić, B., Vanja, B.-S., Aleksandra, P., Milica, K., Neda, B., Duško, Č. (2019). First report of eyeworm infection by *Thelazia callipaeda* in gray wolf (*Canis lupus*) from Serbia. *Parasitol. Res*, 118(12), 3549–3553. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06519-z>.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Guerrero, I., Miró, G., Molina, R. (2011). Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector in the Madrid region (Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(7), 799–806. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0109>
- Gama, A., Pires, I., Canado, M., Coutinho, T., Lopes, A.P., Latrofa, M.S., Cardoso, L., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2016). First report of *Thelazia callipaeda* infection in wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Portugal. *Parasit. Vectors*, 9, 236. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1526-1>.
- Gasser, R.B., Newton, S.E. (2000). Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects. *Int. J. Parasitol.*, 30, 509–534. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00021-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00021-7).
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF). (s.f.). GBIF *Glob. Biodivers. Inf. Facil.* Disponible en: [https://www.gbif.org/occurrence/search?offset=40&taxon\\_key=1560778](https://www.gbif.org/occurrence/search?offset=40&taxon_key=1560778). (Fecha de acceso: 29/04/2021).
- Geden, C., Stoffolano, J. (1981). Geographic Range and Temporal Patterns of Parasitization of *Musca Autumnalis* (Diptera: Muscidae) by *Thelazia* Sp. (Nematoda: Spirurata) in Massachusetts, with Observations on *Musca Domestica* (Diptera: Muscidae) as an Unsuitable Intermediate Host. *J. Med. Entomol.*, 18, 449–456. <https://doi.org/10.1093/jmedent/18.6.449>.
- Genchi, C., Rossi, L., Cardini, G., Kramer, L.H., Venco, L., Casiraghi, M., Genchi, M., Agostini, A. (2002). Full season efficacy of moxidectin microsphere sustained release formulation for the prevention of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Vet. Parasitol.*, 110, 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00325-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00325-4).
- Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G., Genchi, M. (2011). Changing climate and changing vector-borne disease distribution: The example of *Dirofilaria* in Europe. *Vet. Parasitol.*, 176, 295–299. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.012>.
- Genchi, C., Kramer, L.H. (2020). The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. *Vet. Parasitol.*, 280, 108995. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108995>.
- Geneious. (s.f.) *Molecular Biology and NGS Analysis Tools*. Disponible en: <http://www.geneious.com>. (Fecha de acceso: 09.05.2017).
- Gerrikagoitia X., Barral M., Juste R.A. (2010) *Angiostrongylus* species in wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet Parasitol.*, 174, 175–180
- Gibbs, D. (2003). *Amiota variegata* (Diptera, Drosophilidae) new for Gloucestershire. *Dipter. Dig.*, 10, 113.
- Gómez-Couso, H., Gomez-Rial, M.A., Cid-Lama, A., Ares-Mazás, E. (2013). Human thelaziosis in Galicia (Northwest Spain): report of a clinical case. En: *XVIII*

- Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA), Gran Canaria, España.
- González Jiménez, R., Ríos, A., Montoya, A. (2013). Estudio epidemiológico de la thelaziosis canina en 91 perros de los valles del Jerte y del Tormes. *Argos - Inf. Vet.*, 152, 56–58.
- Gordon, C.A., McManus, D.P., Jones, M.K., Gray, D.J., Gobert, G.N. (2016). The Increase of Exotic Zoonotic Helminth Infections. *Advances in Parasitology*, 91, 311–397. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.12.002>.
- Graham-Brown, J., Gilmore, P., Williams, D., Barber, J., Andrews, M., Timofte, D. (2016). Case of canine ocular thelaziosis in the UK. *Vet. Rec.*, 179, 51. <https://doi.org/10.1136/vr.i3743>.
- Graham-Brown, J., Gilmore, P., Colella, V., Moss, L., Dixon, C., Andrews, M., Arbeid, P., Barber, J., Timofte, D., McGarry, J., Otranto, D., Williams, D. (2017). Three cases of imported eyeworm infection in dogs: a new threat for the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 181(13), 346. <https://doi.org/10.1136/vr.104378>.
- Guisado, A., Sanz, F. (2010). Conjuntivitis en un perro por *Thelazia callipaeda*. En: *6º Congreso Andaluz de Veterinarios*. Benalmádena, Málaga, España.
- Hadži-Milić, M., Ilić, T., Stepanović, P., Đorđević, J., Dimitrijević, S. (2016). Serbia: Another endemic region for canine ocular thelaziosis. *Med. Weter.*, 72, 558–563. <https://doi.org/10.21521/mw.5561>.
- Hammerich, H., Dickomeit, M., Glatz, J. (2020). Thelaziose-induzierte Konjunktivitis bei einem Hund in Deutschland. *Prakt Tierarzt*, 101, 138–147.
- Hammond, A. (2018). *Thelazia callipaeda* in a travelled dog in England. *Vet. Rec.*, 183 (15), 477. <https://doi.org/10.1136/vr.k4340>.
- Hermosilla, C., Herrmann, B., Bauer, C. (2004). First case of *Thelazia callipaeda* infection in a dog in Germany. *Vet. Rec.*, 154(18), 568–569.
- Hermosilla, C., Hetzel, U., Bausch, M., Grubl, J., Bauer, C. (2005). First autochthonous case of canine ocular onchocercosis in Germany. *Vet. Rec.*, 156(14), 450–451. <https://doi.org/10.1136/vr.156.14.450>.
- Hermosilla, C., Pantchev, N., Dyachenko, V., Gutmann, M., Bauer, C. (2006). First autochthonous case of canine ocular *Dirofilaria repens* infection in Germany. *Vet. Rec.*, 158(4), 134–135. <https://doi.org/10.1136/vr.158.4.134>.
- Hernández, I.A., Ruiz de Ybáñez, R., Martínez Rondán, F., González, M., Escribano, F., Muñoz, C., Rojas, A., Baneth, G., Martínez-Carrasco, C. (2019). Study of *Otodectes cynotis* and *Thelazia callipaeda* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from semiarid habitats of the Iberian Peninsula. En: *XXI Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA)*, Vigo, Pontevedra, España.
- Hernández, L., Checa, R., Montoya, A., Carrasco, J., Miró, G. (2012b). Diagnóstico de la thelaziosis canina. *Canis et Felis*, 119, 36–46.
- Hernández, L., Montoya A., Checa R., Dado D., Bello A., Vázquez MV., Benito M., Villagrasa M., Ribas F., San Jorge J., Miró G. (2012a). Primera denuncia de la infección por *Thelazia callipaeda* en gatos en España. En: *XXIX Congreso Annual de AMVAC*, Madrid, España.

- Hinney, B., Fuehrer HP., Hodžić A., Joachim A. (2016). *Thelazia callipaeda* in dogs from Austria (abstract in German). En: *Tag. DVG Fachgruppe BParasitologie Parasitäre Krankh*, Berlin, Germany.
- Hodžić, A., Latrofa, M., Annoscia, G., Alić, A., Beck, R., Lia, R., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2014). The spread of zoonotic *Thelazia callipaeda* in the Balkan area. *Parasit. Vectors*, 7, 352. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-352>.
- Hodžić, A., Mrowietz, N., Cézanne, R., Bruckschwaiger, P., Punz, S., Habler, V.E., Tomsik, V., Lazar, J., Duscher, G.G., Glawischnig, W., Fuehrer, H.-P. (2018). Occurrence and diversity of arthropod-transmitted pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) in western Austria, and possible vertical (transplacental) transmission of *Hepatozoon canis*. *Parasitology*, 145, 335–344. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001536>.
- Hodžić, A., Payer, A., Duscher, G.G. (2019). The first autochthonous case of feline ocular thelaziosis in Austria. *Parasitol. Res*, 118, 1321–1324. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06275-0>.
- Hofmannová, L., Otáhal M, Špírek M, Modrý D. (2019). The eyeworm *Thelazia callipaeda*: A new pathogen of dogs in the Czech Republic. *Veterinární Lékař*, 17, 19–22.
- Hong, S.T., Lee, S.H., Shim, Y.B., Choi, J.S., Choe, J.K. (1981). [A Human Case Of Thelaziasis In Korea]. *Kisaengchunghak Chapchi* 19(1), 76–80. <https://doi.org/10.3347/kjp.1981.19.1.76>.
- Hossain, M.I., Hossain, M.A., Nahar, L., Hossain, M.M., Mondal, A.S., Alim, M.A., Mahmud, M.C., Islam, A. (2011). Human Thelaziasis in Bangladesh. *Mymensingh Med. J. MMJ*, 20, 128–130.
- Hu, M., Chilton, N.B., Gasser, R.B. (2004). The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: recent progress, and implications for population genetics and systematics. *Adv. Parasitol*, 56, 133–212. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(03\)56003-1](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(03)56003-1).
- Iberfauna. (2008). *Species Amiota (Phortica) variegata (Fallén 1823)* En: IBERFAUNA El Banco Datos Fauna Ibérica Mus. Nac. Cienc. Nat. CSIC. <http://iberfauna.mncn.csic.es/showficha.aspx?rank=T&idtax=50760> (Fecha de acceso: 14/07/2020).
- Ionică, A.M., Deak, G., Matei, I.A., D'Amico, G., Cotuțiu, V.D., Gherman, C.M., Mihalca, A.D. (2018). *Thelazia callipaeda*, an Endemic Parasite of Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Western Romania. *J. Wildl. Dis*, 54, 829–833. <https://doi.org/10.7589/2017-10-251>.
- Ionică, A.M., Deak, G., D'Amico, G., Stan, G.F., Chișamera, G.B., Constantinescu, I.C., Adam, C., Lefkaditis, M., Gherman, C.M., Mihalca, A.D. (2019). *Thelazia callipaeda* in mustelids from Romania with the European badger, *Meles meles*, as a new host for this parasite. *Parasit. Vectors*, 12, 370. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3631-4>.
- Ioniță, M., Mitrea, I.L., Ionică, A.M., Morariu, S., Mihalca, A.D. (2016). New Cases of *Thelazia callipaeda* Haplotype 1 in Dogs Suggest a Wider Distribution in Romania. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, 16, 172–175. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1919>.

- Janssens, G., Clarebout, E. (2006). First case of dacryocystitis due to *Thelazia callipaeda* in a dog in Belgium. En: *European College of Veterinary Ophthalmologists and European Society of Veterinary Ophthalmology Congress*, abstract 39, *Veterinary Ophthalmology* 9, 426–434. Brujas, Bélgica.
- Jirku, M., Kuchta, R., Gricaj, E., Modry, D., Pomajbikova, K.J. (2020). Canine thelaziosis in the Czech Republic: the northernmost autochthonous occurrence of the eye nematode *Thelazia callipaeda* Railliet et Henry, 1910 in Europe. *Folia Parasitol*, 67. <https://doi.org/10.14411/fp.2020.010>.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.
- Karamon, J., Dąbrowska, J., Kochanowski, M., Samorek-Pieróg, M., Sroka, J., Różycki, M., Bilska-Zajac, E., Zdybel, J., Cencek, T. (2018). Prevalence of intestinal helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Europe (Poland): a significant zoonotic threat. *Parasit. Vectors* 11, 436. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3021-3>.
- Kim, H.W., Kim, J.L., Kho, W.G., Hwang, S.Y., Yun, I.H. (2010). Intraocular infestation with *Thelazia callipaeda*. *Jpn. J. Ophthalmol*, 54, 370–372. <https://doi.org/10.1007/s10384-010-0822-0>.
- Kim, J.-H., Lee, S.-J., Kim, M. (2013). *Thelazia callipaeda* discovered by chance during cataract surgery. *BMJ Case Rep*. 2013, bcr2013201214 <https://doi.org/10.1136/bcr-2013-201214>.
- Kosin, E., Kosman, M.L., Depary, A.A. (1989). First case of human Thelaziasis in Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 20, 233–236.
- Koyama, Y., Ohira, A., Kono, T., Yoneyama, T., Shiwaku, K. (2000). Five cases of Thelaziasis. *Br. J. Ophthalmol*, 84(4), 441. <https://doi.org/10.1136/bjo.84.4.439c>.
- Kozlov, D.P. (1962). The life-cycle of the nematode, *Thelazia callipaeda* parasitic in the eye of man and carnivores. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 142(3), 732–733.
- Kozlov, D.P. (1963). Biology of *Thelazia callipaeda* Railliet et Henry, 1910. [en Ruso] *Tr. Gelmintologicheskoi Lab*, 13, 330–346.
- Kregel-Weber, M.K., Delling, C., Dyachenko, V., Lüttgenau, H. (2021). Ocular thelaziosis in a dog in Germany - an autochthonous case? *Tierarztl. Prax. Ausg. K Klientiere Heimtiere*, 49(01), 55–59. <https://doi.org/10.1055/a-1323-2297>.
- Külekcı, P.Y., Külekcı, G., Güney, M. (2020). Eyeworm Infection (Thelaziosis) in a Dog: A New Threat for Dogs in Turkey. *J. Istanb. Vet. Sci*, 78–78.
- Kunavisarut, P., Patikulsila D, Somboon P, Pathanapitoon K, Rothova A, (2014). Subretinal *Thelazia*-induced diffuse unilateral subacute neuroretinitis. *JAMA Ophthalmol*, 132, 896–898. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.346>.
- Labelle, A.L., Daniels, J.B., Dix, M., Labelle, P., (2011). *Onchocerca lupi* causing ocular disease in two cats. *Vet. Ophthalmol*, 14 Suppl 1, 105–110. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2011.00911.x>.
- Lebedewa, S.L., Tkocz, K., Clausen, P.-H., Nijhof, A.M. (2020). Suspected autochthonous *Thelazia callipaeda* infection in a dog in northern Germany.

- Parasitol. Res*, 119(12), 4277-4280. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06920-z>.
- Lebon, W., Guillot, J., Álvarez, M.-J., Bazaga, J.A., Cortes-Dubly, M.-L., Dumont, P., Eberhardt, M., Gómez, H., Pennant, O., Siméon, N., Beugnet, F., Halos, L. (2019). Prevention of canine ocular thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) with a combination of milbemycin oxime and afoxolaner (Nexgard Spectra®) in endemic areas in France and Spain. *Parasite*, 26, 1. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019001>.
- Lechat, C., Siméon, N., Pennant, O., Desquilbet, L., Chahory, S., Lesueur, C., Guillot, J. (2015). Comparative evaluation of the prophylactic activity of a slow-release insecticide collar and a moxidectin spot-on formulation against *Thelazia callipaeda* infection in naturally exposed dogs in France. *Parasit. Vectors*, 8, 93. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0696-6>.
- Lee, J., Chung, S.-H., Lee, S.C., Koh, H.J. (2006). A technique for removal of a live nematode from the vitreous. *Eye*, 20, 1444–1446. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6702308>.
- Lia, R.P., Garaguso, M., Otranto, D., Puccini, V. (2000). First report of *Thelazia callipaeda* in Southern Italy, Basilicata region. *Acta VIII Eur. Multicolloquium Parasitol. Acta Parasitol*, 45, 178.
- Lia, R.P., Traversa, D., Agostini, A., Otranto, D. (2004). Field efficacy of moxidectin 1 per cent against *Thelazia callipaeda* in naturally infected dogs. *Vet. Rec*, 154, 143–145.
- Liu, S.N., Xu, F.F., Chen, W.Q., Jiang, P., Cui, J., Wang, Z.Q., Zhang, X. (2020). A Case of Human Thelaziasis and Review of Chinese Cases. *Acta Parasitol*, 65, 783–786. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00190-6>.
- López-Beceiro, A.M., Marino, V., Checa, R., Barrera, J.P., Montoya, A., Galvez, R., Fidalgo, L.E., Miró, G. (2017). Impact of the dispersion of *Thelazia callipaeda* infection in wild animals: reporting cases in 34 foxes from Lugo and Ourense (Galicia-NW Spain). En: *Xth Int. Symp. WILD FAUNA - ISoWIF*, Vila Real, Portugal.
- López Medrano, R., Guerra Calleja, G., Díez Morrondo, C., Panadero Fontán, R. (2015). [Ocular thelaziosis, an emergent zoonosis in Spain]. *Med. Clin. (Barc.)*, 145(7), 317–318. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2015.02.014>.
- Loscertales, B., Bonilla, M. (2014). *Thelaziosis ocular canina en Sevilla* | *Argos Portal Veterinaria*, Disponible en: <https://argos.portalveterinaria.com/noticia/11111/articulos-archivo/thelaziosis-ocular-canina-en-sevilla.html>. (Fecha de acceso: 04/02/2019).
- Loyd, K. a. T., Hernández, S.M., Abernathy, K.J., Shock, B.C., Marshall, G.J. (2013). Risk behaviours exhibited by free-roaming cats in a suburban US town. *Vet. Rec*, 173, 295. <https://doi.org/10.1136/vr.101222>.
- Máca, J. (1977). Revision of Palearctic species of *Amiota* subgenus *Phortica* (Diptera, Drosophilidae). *Acta Entomol. Bohemoslov*, 74, 115–130.
- Máca, J., Lin, F.J. (1993). The Drosophilidae of Taiwan: genus *Amiota*, subgenus *Phortica*. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin*, 32(3), 171–183.

- Máca, J. (2003). Taxonomic notes on the genera previously classified in the genus *Amiota* Loew (Diptera: Drosophilidae, Steganinae). *Acta Univ. Carol. Biol*, 47, 247–274.
- Máca, J., Otranto, D. (2014). Drosophilidae feeding on animals and the inherent mystery of their parasitism. *Parasit. Vectors*, 7. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0516-4>.
- Macarie, S.S., Dobre, C., Suciú, M.-C., Ionica, A.-M., Cernea, M.-S., Tarcău, P., Bodea, F. (2017). Subconjunctival ocular filariasis -Case report. *Romanian J. Ophthalmol*, 61, 76–79. <https://doi.org/10.22336/rjo.2017.14>.
- Magnis, J., Naucke, T.J., Mathis, A., Deplazes, P., Schnyder, M. (2009). Local transmission of the eye worm *Thelazia callipaeda* in southern Germany. *Parasitol. Res*, 106, 715–717. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1678-4>.
- Maia, C. Cardoso, L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Vet. Parasitol*, 213, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.003>.
- Maia, C., Catarino, A.L., Almeida, B., Ramos, C., Campino, L., Cardoso, L. (2016). Emergence of *Thelazia callipaeda* Infection in Dogs and Cats from East-Central Portugal. *Transbound. Emerg. Dis*, 63, 416–421. <https://doi.org/10.1111/tbed.12284>.
- Malacrida, F., Hegglin, D., Bacciarini, L., Otranto, D., Nägeli, F., Nägeli, C., Bernasconi, C., Scheu, U., Balli, A., Marengo, M., Togni, L., Deplazes, P., Schnyder, M. (2008). Emergence of canine ocular thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in southern Switzerland. *Vet. Parasitol*, 157, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.029>.
- Manning, S.P. (2007). Ocular examination in the diagnosis of angiostrongylosis in dogs. *Vet. Rec*, 160, 625–627. <https://doi.org/10.1136/vr.160.18.625>.
- Marino, V., Montoya A., Checa R., Gálvez R., Mirò G. (2015). Actualización sobre la dispersión de la infección por *Thelazia callipaeda* en España. En: *XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA)*, Vitoria, España.
- Marino, V., Montoya A., Checa R., Gálvez R., Miró G. (2016). Situación de la thelaziosis en España: ¿Qué ha pasado en los últimos 5 años? En: *51º Congreso Nacional de AVEPA*, Granada, España.
- Marino, V., Gálvez, R., Colella, V., Sarquis, J., Checa, R., Montoya, A., Barrera, J.P., Domínguez, S., Lia, R.P., Otranto, D., Miró, G. (2018a). Detection of *Thelazia callipaeda* in *Phortica variegata* and spread of canine thelaziosis to new areas in Spain. *Parasit. Vectors*, 11, 195. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2773-0>.
- Marino, V., Gálvez, R., Montoya, A., Checa, R., Miró, G. (2018b). Dispersión de la thelaziosis ocular canina y felina en España. Situación actual y Manejo Clínico. *Rev. Científica Esp. Med. Interna Pequeños Anim*, 1(3), 6-17.
- Marino, V., Gálvez R., Montoya A., Checa R., Sarquis J., Barrera J.P., Mirò G. (2018c). A questionnaire-based survey about current situation of *Thelazia callipaeda* infection in Spain: update of reported cases. En: *XII Southern European Veterinary Conference, Congreso de AVEPA-SEVC*, Madrid, España.
- Marino, V., Gálvez, R., Montoya, A., Mascuñán, C., Hernández, M., Barrera, J.P., Domínguez, I., Zenker, C., Checa, R., Sarquis, J., Miró, G. (2020). Spain as a

- dispersion model for *Thelazia callipaeda* eyeworm in dogs in Europe. *Prev. Vet. Med.*, 104883. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104883>.
- Marino, V., Gálvez, R., Mascuñán, C., Domínguez, I., Sarquis, J., Montoya, A., Pedro Barrera, J., Zenker, C., Checa, R., Hernández, M., Miró, G. (2021a). Update on the treatment and prevention of ocular thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) in naturally infected dogs from Spain. *Int. J. Parasitol.*, 51(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.08.007>
- Marino, V., Montoya, A., Mascuñán, C., Domínguez, I., Gálvez, R., Hernández, M., Zenker, C., Checa, R., Sarquis, J., Barrera, J.P., Portero, M., Miró, G. (2021b). Feline thelaziosis (*Thelazia callipaeda*) in Spain: state-of-the-art and first prophylactic trial in cats. *J. Feline Med. Surg.* 1098612X21997625. <https://doi.org/10.1177/1098612X21997625>.
- Marino, V., Barbero S., Montoya A., Gálvez R., Miró, G. (2021c). Primeros casos descritos de la infección por *Thelazia callipaeda* en dos conejos de compañía (*Oryctolagus cuniculus*) en España. En: *XXX Congreso Annual de AMVAC, Madrid, España*.
- Marshall, K.E., Thomas, R.H., Roxin, A., Chen, E.K.Y., Brown, J.C.L., Gillies, E.R., Sinclair, B.J. (2014). Seasonal accumulation of acetylated triacylglycerols by a freeze-tolerant insect. *J. Exp. Biol.*, 217, 1580–1587. <https://doi.org/10.1242/jeb.099838>.
- Martínez-Sánchez, M.I., Bolívar-de-Miguel, G., Cuadros-González, J., Rubio González, J.M. (2021). Ocular thelaziosis: A case report of an emerging zoonosis. *Am. J. Ophthalmol. Case Rep.*, 22, 101045. <https://doi.org/10.1016/j.ajoc.2021.101045>.
- Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H., Roberts, D., Skea, J., Shukla, P., Pirani, A., Moufouma-Okia, W., Péan, C., Pidcock, R., Connors, S., Matthews, J., Chen, Y., Zhou, X., Gomis, M., Lonnoy, E., Maycock, T., Tignor, M., Waterfield, T. (2018). *IPCC, 2018: Global Warming of 1.5°C*. Disponible en: <https://www.ipcc.ch/sr15/> (Fecha de acceso: 13.03.2021).
- Matthews, K.R. (2011). Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites. *Science*, 331, 1149–1153. <https://doi.org/10.1126/science.1198077>.
- McKellar, Q.A., Benchaoui, H.A. (1996). Avermectins and milbemycins. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 19, 331–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1996.tb00062.x>.
- Mech, L.D. (1970). *The wolf: The ecology and behavior of an endangered species*. Garden City, N.Y.: The Natural History Press.
- Mérindol, I., Ravier, J.-F., Halos, L., Guillot, J. (2018). Questionnaire-based survey on distribution of canine ocular thelaziosis in southwestern France. *Vet. Parasitol.*, 253, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.021>.
- Michalski, I. (1976). The efficacy of levamisole and tetramisole in the treatment of Thelaziasis in cattle. *Med Weter.*, 32, 417–419.
- Mihalca, A., D'Amico, G., Scurtu, I., Chirilă, R., Matei, I., Ionică, A. (2015). Further spreading of canine oriental eyeworm in Europe: first report of *Thelazia callipaeda* in Romania. *Parasit. Vectors*, 8, 48. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0663-2>.

- Mihalca, A.D., Ionică, A.M., D'Amico, G., Daskalaki, A.A., Deak, G., Matei, I.A., Şimonca, V., Iordache, D., Modrý, D., Gherman, C.M. (2016). *Thelazia callipaeda* in wild carnivores from Romania: new host and geographical records. *Parasit. Vectors* 9, 350. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1628-9>.
- Miller, M., Hill, S., Sinclair, B. (2019). First Canadian record of the zoophilic fruit fly *Phortica variegata* (Fallén) (Diptera: Drosophilidae). *J. Entomol. Soc. Ont.*, 150, 31–36.
- Mircean, M., Ionică, A.M., Mircean, V., Györke, A., Codea, A.R., Tăbăran, F.A., Taulescu, M., Dumitrache, M.O. (2017). Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitol. Int.*, 66, 331–334. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.02.003>.
- Miró, G., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Vázquez, M., Benito, M., Villagrasa, M., Brianti, E., Otranto, D. (2011). *Thelazia callipaeda*: infection in dogs: a new parasite for Spain. *Parasit. Vectors*, 4, 148. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-148>.
- Miró, G., Montoya, A., Checa, R., Gálvez, R., Mínguez, J.J., Marino, V., Otranto, D. (2016). First detection of *Onchocerca lupi* infection in dogs in southern Spain. *Parasit. Vectors*, 9(1), 290. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1587-1>.
- Miróshnichenko, V.A., Desiaterik, M.P., Novik, A.P., Gorbach, A.P., Papernova, N.I. (1988). [A case of ocular Thelaziasis in a 3-year-old child]. *Vestn. Oftalmol.*, 104, 64.
- Miterpáková, M., Hurníková, Z., Antolová, D., Dubinský, P. (2009). Endoparasites of red fox (*Vulpes vulpes*) in the Slovak Republic with the emphasis on zoonotic species *Echinococcus multilocularis* and *Trichinella* spp. *Helminthologia*, 46, 73–79. <https://doi.org/10.2478/s11687-009-0015-x>.
- Montesel, A., Bendinelli, A., Figus, M., Posarelli, C. (2019). There is a worm in my eye! Ocular dirofilariasis. *Eur. J. Ophthalmol.*, 29(5), NP5–NP8. <https://doi.org/10.1177/1120672118803519>.
- Montoya, A., Vázquez, M.V., Hernández, L., Dado, D., Otranto, D., Miró, G. (2011a). Thelaziosis ocular canina. ¿Una parasitosis emergente en España? *Consulta Difus Vet.*, 178, 43–48.
- Montoya, A., Otranto D., Vázquez M.A., James A., Hernández L., Checa R., Dado D., Miró G. (2011b). Primer caso autóctono de la infección por *Thelazia callipaeda* en gatos en España. En: *XII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA)*, Zaragoza, España.
- Montoya, A., Checa, R., Gálvez, R., Canorea, I., Miró, G. (2013a). Thelaziosis felina. *Canis Felis*, 6, 74–86.
- Montoya, A., Hernández L., Checa R., Gálvez R., Benito M., Carrasco L., Canorea, I., Miró G. (2013b). Estudio comparativo sobre la eficacia de la ivermectina y la moxidectina en el tratamiento y prevención en perros con infección natural por *Thelazia callipaeda*. En: *XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA)*, Gran Canaria, España.
- Motta, B., Schnyder, M., Basano, F., Nägeli, F., Nägeli, C., Schiessl, B., Mallia, E., Lia, R.P., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2012). Therapeutic efficacy of milbemycin oxime/praziquantel oral formulation (Milbemax®) against *Thelazia callipaeda* in

- naturally infested dogs and cats. *Parasit. Vectors*, 5, 85. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-85>.
- Motta, B., Nägeli, F., Nägeli, C., Solari-Basano, F., Schiessl, B., Deplazes, P., Schnyder, M. (2014). Epidemiology of the eye worm *Thelazia callipaeda* in cats from southern Switzerland. *Vet. Parasitol.*, 203, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.009>.
- Naem, S. (2007a). Morphological differentiation among three *Thelazia* species (Nematoda: Thelaziidae) by scanning electron microscopy. *Parasitol. Res*, 101, 145–151. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0432-4>.
- Naem, S. (2007b). *Thelazia rhodesi* (Spirurida, Thelaziidae), bovine eyeworm: morphological study by scanning electron microscopy. *Parasitol. Res.*, 100, 855–860. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0346-1>.
- Naem, S. (2011). *Thelazia Species and Conjunctivitis*, en Z. Pelikan, ed., *Conjunctivitis—A Complex and Multifaceted Disorder*, Rijeka, Croatia, Intech Open Access Press, 201–32. <https://doi.org/10.5772/28335>.
- Nájera F., de Lucas-Veguillas J., Vela Á., López-Fernández M., Martínez-Martínez, P., Mata-Huete, M., Cáceres-Urones, J., Annoscia, G., Otranto, D., Calero-Bernal, R. (2020). First report of *Thelazia callipaeda* in a free-ranging Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) from Spain. *Parasitol. Res*, <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06735-y>.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (s.f.) *The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (Fecha de acceso: 05/09/2017).
- Niewold, F.J.J. (1980). *Aspects of the Social Structure of Red Fox Populations: A Summary*, en E. Zimen, ed., *The Red Fox: Symposium on Behaviour and Ecology, Biogeographica*, Dordrecht, Países Bajos, Springer, 185–193. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-5592-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-017-5592-4_12).
- Nolan, T.J., Lok, J.B. (2012). Macrocyclic lactones in the treatment and control of parasitism in small companion animals. *Curr. Pharm. Biotechnol*, 13, 1078–1094. <https://doi.org/10.2174/138920112800399167>.
- Odoyevskaya, I., Khrustalev, A., Shaitanov, V., Seryodkin, I., Panayotova-Pencheva, M. (2015). Occurrence of the Nematode *Thelazia callipaeda* Railliet and Henry, 1910 (Spirurida, Thelaziidae) in Wild Carnivores in the Russian Far East. *Acta Zool. Bulg*, 67, 561–566.
- O'Hara, J.E., Kennedy, M.J. (1989). Prevalence and intensity of *Thelazia* spp. (Nematoda: Thelazioidea) in a *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae) population from Central Alberta. *J. Parasitol*, 75, 803–806.
- Ohtsu, T., Katagiri, C., Kimura, M.T., Hori, S.H. (1993). Cold adaptations in *Drosophila*. Qualitative changes of triacylglycerols with relation to overwintering. *J. Biol. Chem*, 268, 1830–1834.
- Okamura, I., Nishioka, T., Tomita, S., Yamamoto, H., Yasuda, K., Fukamatsu, H., Sumida, K. (1967). Distribution of *Thelazia callipaeda* in Kumamoto Prefecture. *Kumamoto Igakkai Zasshi, Journal of the Kumamoto Medical Society*, 41(2): 185–188.

- Ortiz, M., Salas, V., Benito, M., Carrasco, J., Villagrasa, M. (2012). Aspectos clínicos de la thelaziosis canina. *Canis Felis*, 119, 26–35.
- Otranto, D., Ferroglio, E., Lia, R.P., Traversa, D., Rossi, L. (2003a). Current status and epidemiological observation of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs, cats and foxes in Italy: a “coincidence” or a parasitic disease of the Old Continent? *Vet. Parasitol*, 116, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.022>.
- Otranto, D., Lia, R.P., Traversa, D., Giannetto, S. (2003b). *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) of carnivores and humans: morphological study by light and scanning electron microscopy. *Parassitologia*, 45, 125–133.
- Otranto, D., Lia, R.P., Buono, V., Traversa, D., Giangaspero, A. (2004). Biology of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) eyeworms in naturally infected definitive hosts. *Parasitology*, 129, 627–633. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006018>.
- Otranto, D., Traversa, D. (2004). Molecular Characterization of the First Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA of the Most Common Species of Eyeworms (Thelazioidea: *Thelazia*). *J. Parasitol*, 90, 185–188. <https://doi.org/10.1645/GE-115R1>.
- Otranto, D., Traversa, D. (2005). *Thelazia* eyeworm: an original endo-and ecto-parasitic nematode. *Trends Parasitol*, 21, 1–4.
- Otranto, D., Lia, R.P., Cantacessi, C., Testini, G., Troccoli, A., Shen, J.L., Wang, Z.X. (2005a). Nematode biology and larval development of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in the drosophilid intermediate host in Europe and China. *Parasitology*, 131, 847. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008395>.
- Otranto, D., Lia, R.P., Testini, G., Milillo, P., Shen, J.L., Wang, Z.X. (2005b). *Musca domestica* is not a vector of *Thelazia callipaeda* in experimental or natural conditions. *Med. Vet. Entomol*, 19, 135–139. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2005.00554.x>.
- Otranto, D., Testini, G., De Luca, F., Hu, M., Shamsi, S., Gasser, R.B. (2005c). Analysis of genetic variability within *Thelazia callipaeda* (Nematoda: Thelazioidea) from Europe and Asia by sequencing and mutation scanning of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene. *Mol. Cell. Probes*, 19, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.05.001>.
- Otranto, D., Brianti, E., Cantacessi, C., Lia, R.P., MáCa, J. (2006a). The zoophilic fruitfly *Phortica variegata*: morphology, ecology and biological niche. *Med. Vet. Entomol*, 20, 358–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00643.x>.
- Otranto, D., Cantacessi, C., Testini, G., Lia, R.P. (2006b). *Phortica variegata* as an intermediate host of *Thelazia callipaeda* under natural conditions: Evidence for pathogen transmission by a male arthropod vector. *Int. J. Parasitol*, 36, 1167–1173. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.006>.
- Otranto, D., Cantacessi, C., Mallia, E., Lia, R.P., (2007). First Report of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in Wolves in Italy. *J. Wildl. Dis*, 43, 508–511. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.3.508>.

- Otranto, D., Wall, R. (2008). New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. *Med. Vet. Entomol*, 22, 291–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00741.x>.
- Otranto, D., Dutto, M. (2008). Human Thelaziasis, Europe. *Emerg. Infect. Dis*, 14, 647–649. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071205>.
- Otranto, Domenico, Stevens, J.R., Cantacessi, C., Gasser, R.B. (2008a). Parasite transmission by insects: a female affair? *Trends Parasitol*, 24, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.005>.
- Otranto, D., Stevens, J.R., Testini, G., Cantacessi, C., Máca, J. (2008b). Molecular characterization and phylogenesis of Steganinae (Diptera, Drosophilidae) inferred by the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1. *Med. Vet. Entomol*, 22, 37–47.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B. (2009a). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol*, 25, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.003>.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B. (2009b). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends Parasitol*, 25, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.02.005>.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Mallia, E., DiGeronimo, P.M., Brianti, E., Testini, G., Traversa, D., Lia, R.P. (2009c). *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in wild animals: Report of new host species and ecological implications. *Vet. Parasitol*, 166, 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.027>.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasit Vectors*, 3(2). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-2>.
- Otranto, D. (2011). *Thelazia callipaeda* Eyeworm: a “neglected” CVBD of human concern. En: *Second International Conference of Southeastern and Eastern European Parasitological Society*, Zagreb, Croatia.
- Otranto, D., Eberhard, M.L. (2011). Zoonotic helminths affecting the human eye. *Parasit Vectors*, 4, 41.
- Otranto, D., Cantacessi, C., Lia, R.P., Kadow, I.C.G., Purayil, S.K., Dantas-Torres, F., Máca, J. (2012). First laboratory culture of *Phortica variegata* (Diptera, Steganinae), a vector of *Thelazia callipaeda*. *J. Vector Ecol*, 37, 458–461. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00251.x>.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petrić, D., Genchi, C., Capelli, G. (2013). Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors*, 6, 16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-16>.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F. (2015). Transmission of the eyeworm *Thelazia callipaeda*: between fantasy and reality. *Parasit. Vectors*, 8, 273. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0881-7>.
- Otranto, D., Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Pfeffer, M., Genchi, C., Guberti, V., Capelli, G., Deplazes, P. (2015). The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: Helminths and arthropods. *Vet. Parasitol*, 213, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.020>.

- Otranto, D., Colella, V., Crescenzo, G., Solari Basano, F., Nazzari, R., Capelli, G., Petry, G., Schaper, R., Pollmeier, M., Mallia, E., Dantas-Torres, F., Lia, R.P. (2016). Efficacy of moxidectin 2.5% and imidacloprid 10% in the treatment of ocular thelaziosis by *Thelazia callipaeda* in naturally infected dogs. *Vet. Parasitol*, 227, 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.035>.
- Otranto, D. (2018). Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: From pathways and times of transmission to disease control. *Vet. Parasitol*, 251, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.021>.
- Otranto, D., Iatta, R., Lia, R.P., Cavalera, M.A., Mâca, J., Pombi, M., Dantas-Torres, F., Jaenike, J. (2018). Competence of *Phortica variegata* from the United States as an Intermediate Host of the *Thelazia callipaeda* Eyeworm. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 98, 1175–1178. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0956>.
- Otranto, D., Deplazes, P. (2019). Zoonotic nematodes of wild carnivores. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl*, 9, 370-383. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.12.011>.
- Otranto, D., Solari Basano, F., Pombi, M., Capelli, G., Nazzari, R., Falsone, L., Petry, G., Pollmeier, M.G., Lia, R.P. (2019). Effectiveness of the spot-on combination of moxidectin and imidacloprid (Advocate®) in the treatment of ocular thelaziosis by *Thelazia callipaeda* in naturally infected cats. *Parasit. Vectors*, 12(25). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3262-1>.
- Palfreyman, J., Graham-Brown, J., Caminade, C., Gilmore, P., Otranto, D., Williams, D.J.L. (2018). Predicting the distribution of *Phortica variegata* and potential for *Thelazia callipaeda* transmission in Europe and the United Kingdom. *Parasit. Vectors*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2842-4>.
- Panadero-Fontán, R., Otranto, D. (2015). Arthropods affecting the human eye. *Vet. Parasitol*, 208, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.022>.
- Papadopoulos, E., Komnenou, A., Thomas, A., Ioannidou, E., Colella, V., Otranto, D. (2017). Spreading of *Thelazia callipaeda* in Greece. *Transbound. Emerg. Dis*, 65(1), 248-252. <https://doi.org/10.1111/tbed.12626>.
- Paradžik, M.T., Samardžić, K., Živičnjak, T., Martinković, F., Janjetović, Ž., Miletić-Medved, M. (2016). *Thelazia callipaeda*—first human case of thelaziosis in Croatia. *Wien. Klin. Wochenschr*, 128, 221–223. <https://doi.org/10.1007/s00508-015-0889-1>.
- Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. (s.f.). Disponible en: <https://www.parquenacionalsierraguadarrama.es/es/parque/info-pnsg> (Fecha de acceso: 24/03/2021).
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J., Hutchens, D.E. (2000). Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *Am. J. Vet. Res*, 61, 482–483. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.482>.
- Pavlovic, I., Jakić-Dimić, D., Kureljušić, B., Duško, Ć., JezdiMiróvić, N., Drobnjak, M., (2017). First occurrence of *Thelazia callipaeda* in foxes (*Vulpes vulpes* L.) in Serbia. *Balk. J. Wildl. Res*, 4, 1–5. <https://doi.org/10.15679/bjwr.v4i1.31>.
- Peterson, A.T., Shaw, J. (2003). *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int. J. Parasitol*, 33, 919–931. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00094-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00094-8).

- Pimenta, P., Cardoso, L., Pereira, M.J., Maltez, L., Coutinho, T., Alves, M.S., Otranto, D. (2013). Canine ocular thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Portugal. *Vet. Ophthalmol*, 16, 312–315. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2012.01074.x>.
- Pradera, C. (2015). El Desinsectador y Desratizador. Mosca *Phortica variegata* (Diptera, Drosophilidae) en el Pallars Sobirà, Lleida. Disponible en: <https://desinsectador.com/2015/10/25/mosca-Phortica-variegata-diptera-drosophilidae-en-el-pallars-sobira-lleida/> (Fecha de acceso: 29/04/2021).
- Rivas Martínez, S. (1983). Pisos bioclimáticos de España. *Lazaroa*, 5, 33–43.
- Rivas-Martínez, S., Gandullo Gutiérrez, J.M., Allué Andrade, J.L., Montero de Burgos, J.L., González Rebollar, J.L. (1987). *Memoria del mapa de series de vegetación de España 1: 400.000*, Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, ICONA.
- Rivas-Martínez, S., Arregui, J.J.L. (1999). Biogeography of the Iberian Peninsula. *Itinera Geobot*, 13, 41–47.
- Rivas-Martínez, S., Sáenz, S., Penas, A. (2011). Worldwide Bioclimatic Classification System. *Glob. Geobot*. 1, 1-634+4 Maps.
- Rodrigues, F.T., Cardoso, L., Coutinho, T., Otranto, D., Diz-Lopes, D. (2012). Ocular thelaziosis due to *Thelazia callipaeda* in a cat from northeastern Portugal. *J. Feline Med. Surg*, 14, 952–954. <https://doi.org/10.1177/1098612X12459645>.
- Roggero, C., Schaffner, F., Bächli, G., Mathis, A., Schnyder, M. (2010). Survey of *Phortica* drosophilid flies within and outside of a recently identified transmission area of the eye worm *Thelazia callipaeda* in Switzerland. *Vet. Parasitol*, 171, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.012>.
- Rolbiecki, L., Izdebska, J.N., Franke, M., Iliszko, L., Fryderyk, S. (2021). The Vector-Borne Zoonotic Nematode *Thelazia callipaeda* in the Eastern Part of Europe, with a Clinical Case Report in a Dog in Poland. *Pathog. Basel Switz*, 10, 55. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010055>.
- Rossi, L., Bertaglia, P.P. (1989). Presence of *Thelazia callipaeda* Railliet & Henry, 1910, in Piedmont, Italy. *Parassitologia*, 31, 167–172.
- Rossi, L., Peruccio, C. (1989). Thelaziosi oculare nel cane: aspetti clinici e terapeutici. *Veterinaria*, 2, 47–50.
- Rossi, L., Ferroglio, E., Frassetto, D. (2002). *Thelazia callipaeda* in foxes from North-West Italy. *Parassitologia*, 44 (Suppl. 1), 159.
- Rossi, L., Rigano, C., Tomio, E., Frassetto, D., Ferroglio, E. (2007). Use of sustained-release moxidectin to prevent eyeworm (*Thelazia callipaeda*) infection in dogs. *Vet. Rec*, 161, 820–821. <https://doi.org/10.1136/vr.161.24.820>.
- Rubin, L.F., Saunders, L.Z., (1965). Intraocular larva migrans in dogs. *Pathol. Vet*, 2, 566–573. <https://doi.org/10.1177/030098586500200604>.
- Ruytoor, P., Déan, E., Pennant, O., Dorchie, P., Chermette, R., Otranto, D., Guillot, J. (2010). Ocular Thelaziosis in Dogs, France. *Emerg. Infect. Dis*, 16, 1943–1945. <https://doi.org/10.3201/eid1612.100872>.

- Ryu, S., Kim, B.I., Lim, J.-S., Tan, C.S., Chun, B.C. (2017). One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. *J. Prev. Med. Public Health Yebang Uihakhoe Chi*, 50, 411–414. <https://doi.org/10.3961/jpmph.17.097>.
- Sah, R., Khadka, S., Adhikari, M., Niraula, R., Shah, A., Khatri, A., Donovan, S. (2018). Human Thelaziasis: Emerging Ocular Pathogen in Nepal. *Open Forum Infect. Dis*, 15, 5(10):ofy237. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy237>.
- Sánchez-Murillo, J.M., Alarcón-Elbal P.M., Sánchez-Moro J., Bravo-Barriga D., Blanco-Ciudad J., Calero-Bernal R., Frontera E., Reina D. (2013). Primer diagnóstico de thelaziosis ocular canina en la provincia de Badajoz (España). En: *XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA)*, Gran Canaria, España.
- Sargo, R., Loureiro, F., Catarino, A.L., Valente, J., Silva, F., Cardoso, L., Otranto, D., Maia, C. (2014). First report of *Thelazia callipaeda* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *J. Zoo Wildl. Med*, 45, 458–460. <https://doi.org/10.1638/2013-0294R.1>.
- Schäfer, I., Volkmann, M., Beelitz, P., Merle, R., Müller, E., Kohn, B. (2019). Retrospective evaluation of vector-borne infections in dogs imported from the Mediterranean region and southeastern Europe (2007–2015). *Parasit. Vectors*, 12, 30. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3284-8>.
- Schottstedt, T. (2009). Okuläre Thelaziose bei einem Hund, *Kleintierpraxis* 54, 160-163.
- Seixas, F., Travassos, P., Coutinho, T., Lopes, A.P., Latrofa, M.S., Pires, M. dos A., Cardoso, L., Otranto, D., (2018). The eyeworm *Thelazia callipaeda* in Portugal: Current status of infection in pets and wild mammals and case report in a beech marten (*Martes foina*). *Vet. Parasitol*, 252, 163–166. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.007>.
- Semenza, J.C., Suk, J.E. (2018). Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiol. Lett*, 1, 365(2):fnx244. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx244>
- Seo, M., Yu, J.-R., Park, H.-Y., Huh, S., Kim, S.-K., Hong, S.-T. (2002). Enzooticity of the dogs, the reservoir host of *Thelazia callipaeda*, in Korea. *Korean J. Parasitol*, 40, 101–103. <https://doi.org/10.3347/kjp.2002.40.2.101>.
- Sharma, A., Pandey, M., Sharma, V., Kanga, A., Gupta, M.L. (2006). A case of human Thelaziasis from Himachal Pradesh. *Indian J. Med. Microbiol*, 24, 67–69. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.19902>.
- Shen, J., Gasser, R.B., Chu, D., Wang, Z., Yuan, X., Cantacessi, C., Otranto, D. (2006). Human thelaziosis-a neglected parasitic disease of the eye. *J. Parasitol*, 92, 872–876.
- Shi, Y.E., Han, J.J., Yang, W.Y., Wei, D.X. (1988). *Thelazia callipaeda* (Nematoda: Spirurida): transmission by flies from dogs to children in Hubei, China. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 82, 627.
- Sidorenko V.S. (2002). Phylogeny of the tribe Steganini Hendel and some related taxa (Diptera: Drosophilidae). *Far Eastern Entomologist*, 111, 1–20.
- Silva, L.M.R., Spoerel, S., Wiesner, L., Klein, M., Pantchev, N., Taubert, A., Hermosilla, C. (2020). Ophthalmic *Thelazia callipaeda* infections: first feline and new canine

- imported cases in Germany. *Parasitol. Res*, 119(9), 3099-3104  
<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06785-2>.
- Sinclair, B.J., Marshall, K.E. (2018). The many roles of fats in overwintering insects. *J. Exp. Biol*, 221 (Suppl\_1): jeb161836. <https://doi.org/10.1242/jeb.161836>.
- Singh, T.S., Singh, K.N. (1993). Thelaziasis: report of two cases. *Br. J. Ophthalmol*, 77, 528–529. <https://doi.org/10.1136/bjo.77.8.528>.
- Sistema de observación meteorológica. (s.f.) Disponible en: <https://www.parquenacionalsierraguadarrama.es/en/nature/climate/302-sistema-observacion-meteo> (Fecha de acceso: 24/07/2020).
- Skrjabin, K.I., Sobolev, A.A., Ivashkin, V.M. (1967). Principles of Nematology, vol. IX. Spirurata of Animals and Man and the Disease Caused by Them. Part. 4: Thelazioidea. *Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR*, Moscú. English translation Published by Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.
- Smeal, M.G. (1968). Observations on the occurrence of *Thelazia* or eyeworm infection of cattle in northern New South Wales. *Aust. Vet. J*, 44, 516–521. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1968.tb09004.x>.
- Soares, C., Sousa, S.R., Anastácio, S., Matias, M.G., Marquês, I., Mascarenhas, S., Vieira, M.J., de Carvalho, L.M., Otranto, D., (2013). Feline thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in Portugal. *Vet. Parasitol.* 196, 528–531. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.029>.
- Sohn, W.-M., Na, B.-K., Yoo, J.M. (2011). Two cases of human Thelaziasis and brief review of Korean cases. *Korean J. Parasitol*, 49, 265–271. <https://doi.org/10.3347/kjp.2011.49.3.265>.
- Stuckey, E.J. (1917). Circumocular filariasis. *China Med Jour*, 31, 24.
- Tahir, D., Davoust, B., Parola, P. (2019). Vector-borne nematode diseases in pets and humans in the Mediterranean Basin: An update. *Vet. World*, 12, 1630–1643. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1630-1643>.
- Tasić-Otašević, S., Gabrielli, S., Trenkić-Božinović, M., Petrović, A., Gajić, B., Colella, V., Momčilović, S., Cancrini, G., Otranto, D. (2016). Eyeworm infections in dogs and in a human patient in Serbia: A One Health approach is needed. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, 45, 20–22. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.003>.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2010). *Veterinary Parasitology*, Prima edizione italiana, Roma, Blackwell Publishing.
- The Editors, Japanese Journal of Ophthalmology (2011). Intraocular infestation with *Thelazia callipaeda*. *Jpn. J. Ophthalmol*, 55, 433–434. <https://doi.org/10.1007/s10384-011-0050-2>.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25, 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>.
- Tosco, S., Chiartano M., Raviri G., Raineri R., Tomio E., Armand-Pilon S., Rossi L. (2010). Indagine sulla thelaziosi oculare felina da *Thelazia callipaeda* nel nord

- Italia: dalla percezione presso i veterinari fino al trattamento. *Veterinaria*, 24, 33–44.
- Tudor, P., Bădicu, A., Mateescu, R., Tudor, N., Mateescu, C., Ionașcu, I. (2016a). First report of canine ocular thelaziosis in the Muntenia Region, Romania. *Parasitol. Res*, 115, 1741–1744. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4964-y>.
- Tudor, P., Turcitu, M., Mateescu, C., Dantas-Torres, F., Tudor, N., Bărbuceanu, F., Ciuca, L., Burcoveanu, I., Acatrinei, D., Rinaldi, L., Mateescu, R., Bădicu, A., Ionașcu, I., Otranto, D. (2016b). Zoonotic ocular onchocercosis caused by *Onchocerca lupi* in dogs in Romania. *Parasitol. Res*, 115, 859–862. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4816-1>.
- Tudor, P., Ionascu, I. (2017). *Thelazia callipaeda* infection in dogs from Bucharest and surrounding areas. En: *J. Biotechnol., European Biotechnology Congress*, Dubrovnik, Croatia. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.954>.
- Udiz-Rodríguez, R., Garcia-Livia, K., Valladares-Salmerón, M., Dorta-Almenar, M.N., Martín-Carrillo, N., Martín-Alonso, A., Izquierdo-Rodríguez, E., Feliu, C., Valladares, B., Foronda, P. (2018). First ocular report of *Gurltia paralyans* (Wolffhügel, 1933) in cat. *Vet. Parasitol*, 255, 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.027>.
- Vaissaire, J., Mendy, C., Le Doujet, C., Le Coustumier, A. (2005). [Tularemia. The disease and its epidemiology in France]. *Med. Mal. Infect*, 35, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.03.005>.
- Vieira, L., Rodrigues, F.T., Costa, Á., Diz-Lopes, D., Machado, J., Coutinho, T., Tuna, J., Latrofa, M., Cardoso, L., Otranto, D. (2012). First report of canine ocular thelaziosis by *Thelazia callipaeda* in Portugal. *Parasit. Vectors*, 5, 124. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-124>.
- Viriyavejakul, P., Krudsood, S., Monkhonmu, S., Punsawad, C., Riganti, M., Radomyos, P. (2012). *Thelazia callipaeda*: a human case report. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 43, 851–856.
- Wagner, R., Wendlberger, U. (2000). Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. mites. *Vet. Parasitol*, 93, 149–158. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00357-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00357-5).
- Wang, S., Yu, S.-J., Wang, X.-L., Zhao, M.-Y., Deng, S., Shang, H., An, C.-L. (2014). A pediatric case report and literature review of thelaziosis in China. *Int. J. Infect. Dis*, 29, 249–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.10.016>.
- Wang, X.-L., Guo, J.-Y., Wang, Xue-Lian, Ma, X.-L., Wang, Y., An, C.-L. (2014). Two cases of human Thelaziasis as confirmed by mitochondrial cox1 sequencing in China. *Pathog. Glob. Health*, 108, 298–301.
- Wang, Z.X., Wang, K. C., Chen, Q. (2002). Experimental studies on the Susceptibility of *Thelazia callipaeda* to *Amiota okadai* in three provinces of China. *Chin. J. Zoonoses*, 18, 61–63.
- Wang, Z.X., Hu, Y., Shen, J., Wang, K., Wang, H., Jiang, B., Zhao, P., Wang, Zhi-cheng, Ding, W., Wang, F., Xia, X. (2003). [Longitudinal investigation and experimental studies on Thelaziasis and the intermediate host of *Thelazia callipaeda* in Guanghua county of Hubei province]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi*, 24(7), 588–590.

- Werner, T., Jaenike, J. (2017). *Drosophilids* of the Midwest and Northeast. University of Rochester, Rochester, NY. River Campus Libraries.
- World Health Organization (WHO). (s.f.). *Onchocerciasis (river blindness)*. Disponible en: <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/onchocerciasis> (Fecha de acceso: 14/04/2021).
- Yamaguti, S. (1961). Sistema Helminthum. Vol. III *The Nematodes of Vertebrates Part I*, New York, Interscience Publishers, Inc.
- Yang, Y.-J., Liag, T.-H., Lin, S.-H., Chen, H.-C., Lai, S.-C. (2006). Human Thelaziasis occurrence in Taiwan. *Clin. Exp. Optom*, 89, 40–44. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2006.00008.x>.
- Yassin, A. (2013). Phylogenetic classification of the Drosophilidae Rondani (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. *Syst. Entomol*, 38, 349–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2012.00665.x>
- Yipeng, J., Zichen, L., Jiaqi, W., Yifan, W., Nianjun, H., Liubin, T., Degui, L., Jiahao, L. (2020). First report of *Thelazia callipaeda* infection in *Phortica okadai* and wildlife in national nature reserves, China. *Parasites Vectors*, 14, 13 <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04509-0>.
- Zakir, R., Zhong-Xia, Z., Chioddini, P., Canning, C.R. (1999). Intraocular infestation with the worm, *Thelazia callipaeda*. *Br. J. Ophthalmol*, 83, 1194–1195.
- Zhang, X., Shi, Y.L., Han, L.L., Xiong, C., Yi, S.Q., Jiang, P., Wang, Z.X., Shen, J.L., Cui, J., Wang, Z.Q. (2018). Population structure analysis of the neglected parasite *Thelazia callipaeda* revealed high genetic diversity in Eastern Asia isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis*, 12(1): e0006165. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006165>.



## **9. ANEXOS**

---



# 9. ANEXOS

## Anexo 1. Formulario para la notificación de nuevos casos



Clinica Veterinaria (sello):  
Responsable veterinario:  
Dirección:  
Teléfono:  
Correo electrónico:

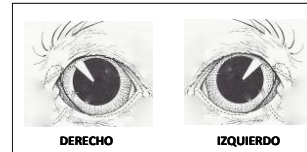
Avda. Puerta de Hierro s/n  
Dpto. Sanidad Animal  
Facultad de Veterinaria (UCM)  
28040 Madrid  
Teléfono: 635010924/913943906  
(VALENTINA MARINO)

### FICHA THELAZIOSIS OCULAR

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Nombre animal: \_\_\_\_\_  
Localidad donde se ubica el perro: \_\_\_\_\_  
Tipo de vivienda: piso      chalet      otros  
Propietario (Nombre y dirección completa): \_\_\_\_\_  
Tlf.: \_\_\_\_/\_\_\_\_      Móvil de contacto \_\_\_\_\_

### RESEÑA

Raza: .....      Edad: .....  
Capa: .....      Sexo: .....  
Esterilización: No      Si  
Peso/Talla: .....  
Procedencia:       Vagabundo       Dueño       Explotación  
Convive con otros animales: No      Sí (especificar):  
Duerme fuera de casa: No      Sí  
Caza: No      Si  
Historial de viajes: ¿Ha salido de la zona?: No      Sí  
(Especificar):



Presencia de vermes oculares: No      Si  
Numero de vermes en ojo  
derecho: \_\_\_\_ / izquierdo: \_\_\_\_  
Descripción lesiones oculares: .....  
.....

### ESTADO SANITARIO

Asintomático   
Signos clínicos (especificar):  
Condición corporal: Normal  Caquéctico  Delgado  Obeso   
Analíticas previas: No      Sí (especificar):  
Presencia de ectoparásitos: No      Sí: pulgas      garrapatas

Medidas preventivas aplicadas (antiparasitario y posología): .....

Enfermedades concomitantes:

Otras enfermedades analizadas:

Leishmaniosis	No	Si	Técnica:	Resultado:
Erhlichiosis	No	Si	Técnica:	Resultado:
Anaplasmosis	No	Si	Técnica:	Resultado:
Filariosis:	No	Si	Técnica:	Resultado:
Otros (especificar):	_____		Técnica:	Resultado:

Tratamiento empleado (especificar principio activo y posología): .....

Observaciones:

.....  
.....

**Anexo II. Ficha de seguimiento del estudio terapéutico de los perros tratados con Milbemax® (Milbemicina oxima 12,5 mg + praziquantel 125 mg)**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**  
**LABORATORIO DE EPICONTROL-CARNÍVOROS**

**FICHA DE SEGUIMIENTO DEL ESTUDIO TERAPEUTICO DE LOS PERROS TRATADOS CON Milbemax® (Milbemicina)**

NOMBRE DEL PERRO:				APELLIDOS DEL PROPIETARIO:
Visita al veterinario	Tiempo	Tratamiento/ Exploración ocular	Fecha	Estado general del perro <i>Aquí podrá usted anotar sus comentarios sobre estado general de su perr después de la</i>
Visita 1	Inclusión y tratamiento del animal enfermo	E+T		
Visita 2	A los 7 días del tratamiento (D7)	E+T		
Visita 3	A los 30 días del tratamiento (D30)	E+T		
Visita 4	A los 60 días del tratamiento (D60)	E+T		
Visita 5	A los 90 días del tratamiento (D90)	E+T		
Visita 6	A los 120 días del tratamiento (D120)	E+T		
Visita 7	A los 150 días del tratamiento (D150)	E+T		
Visita 8	A los 180 días del tratamiento (D180)	E+T		
Visita 9	A los 210 días del tratamiento (D210)	E+T		
Visita 10	A los 240 días del tratamiento (D240)	E+T		
Visita 11	A los 270 días del tratamiento (D270)	E+T		
Visita 12	A los 300 días del tratamiento (D300)	E+T		
Visita 13	A los 330 días del tratamiento (D330)	E+T		
Visita 14	A los 365 días del tratamiento (D365)	E+T		

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO**

Me comprometo a realizar las 14 visitas programadas para conocer el estado clínico de mi perro después del tratamiento con Milbemax®

Fecha:.....

Firma propietario

VºBº Veterinario Responsable

### Anexo III. Ficha de seguimiento del estudio terapéutico de los perros tratados con Guardian® (Moxidectina 10 g)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL  
LABORATORIO DE EPICONTROL-CARNÍVOROS

#### FICHA DE SEGUIMIENTO DEL ESTUDIO TERAPEUTICO DE LOS PERROS TRATADOS CON Guardian® (Moxidectina)

NOMBRE DEL PERRO:				APELLIDOS DEL PROPIETARIO:
Visita al veterinario	Tiempo	Tratamiento/ Exploración ocular	Fecha	Estado general del perro <i>Aquí podrá usted anotar sus comentarios sobre estado general de su perro</i>
Visita 1	Inclusión y tratamiento del animal enfermo (D0)	E+T		
Visita 2	A los 7 días del tratamiento (D7)	E		
Visita 3	A los 30 días del tratamiento (D30)	E		
Visita 4	A los 60 días del tratamiento (D60)	E		
Visita 5	A los 90 días del tratamiento (D90)	E		
Visita 6	A los 120 días del tratamiento (D120)	E		
Visita 7	A los 150 días del tratamiento (D150)	E		
Visita 8	A los 180 días del tratamiento (D180)	E+T		
Visita 9	A los 210 días del tratamiento (D210)	E		
Visita 10	A los 240 días del tratamiento (D240)	E		
Visita 11	A los 270 días del tratamiento (D270)	E		
Visita 12	A los 300 días del tratamiento (D300)	E		
Visita 13	A los 330 días del tratamiento (D330)	E		
Visita 14	A los 365 días del tratamiento (D365)	E		

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Me comprometo a realizar las 14 visitas programadas para conocer el estado clínico de mi perro después del tratamiento con Guardian®

Fecha:.....

Firma propietario

VºBº Veterinario Responsable

**Anexo IV. Ficha de seguimiento del estudio terapéutico de los perros tratados con Advocate® (Moxidectina 2,5 mg/ml + imidacloprid 10 mg/ml)**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**  
**LABORATORIO DE EPICONTROL-CARNÍVOROS**

**FICHA DE SEGUIMIENTO DEL ESTUDIO TERAPEUTICO DE LOS PERROS TRATADOS CON Advocate® (Moxidectina)**

NOMBRE DEL PERRO:				APELLIDOS DEL PROPIETARIO:
Visita al veterinario	Tiempo	Tratamiento/ Exploración ocular	Fecha	Estado general del perro <i>Aquí podrá usted anotar sus comentarios sobre estado general de su perr después de la</i>
Visita 1	Inclusión y tratamiento del animal enfermo	E+T		
Visita 2	A los 14 días del tratamiento (D14)	E		
Visita 3	A los 30 días del tratamiento (D30)	E+T		
Visita 4	A los 60 días del tratamiento (D60)	E+T		
Visita 5	A los 90 días del tratamiento (D90)	E+T		
Visita 6	A los 120 días del tratamiento (D120)	E+T		
Visita 7	A los 150 días del tratamiento (D150)	E+T		
Visita 8	A los 180 días del tratamiento (D180)	E+T		
Visita 9	A los 210 días del tratamiento (D210)	E+T		
Visita 10	A los 240 días del tratamiento (D240)	E+T		
Visita 11	A los 270 días del tratamiento (D270)	E+T		
Visita 12	A los 300 días del tratamiento (D300)	E+T		
Visita 13	A los 330 días del tratamiento (D330)	E+T		
Visita 14	A los 365 días del tratamiento (D365)	E+T		

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO**

Me comprometo a realizar las 14 visitas programadas para conocer el estado clínico de mi perro después del tratamiento con Advocate®

Fecha:.....

Firma propietario

VºBº Veterinario Responsable

## Anexo V. Ficha de seguimiento del estudio terapéutico de los perros tratados con Ivomec® (Ivermectina 10 mg/ml diluidos en propilenglicol)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL  
LABORATORIO DE EPICONTROL-CARNÍVOROS

### FICHA DE SEGUIMIENTO DEL ESTUDIO TERAPEUTICO DE LOS PERROS TRATADOS CON Ivomec® (Ivermectina en gotas oculares)

NOMBRE DEL PERRO:				APELLIDOS DEL PROPIETARIO:
Visita al veterinario	Tiempo	Tratamiento/ Exploración ocular	Fecha	Estado general del perro <i>Aquí podrá usted anotar sus comentarios sobre estado general de su perr después de la</i>
Visita 1	Inclusión y tratamiento del animal enfermo	E+T		
Visita 2	A los 7 días de la inclusión (D7)	E+T		
Visita 3	A los 30 días de la inclusión (D30)	E+T		
Visita 4	A los 60 días de la inclusión (D60)	E+T		
Visita 5	A los 90 días de la inclusión (D90)	E+T		
Visita 6	A los 120 días de la inclusión (D120)	E+T		
Visita 7	A los 150 días del tratamiento (D150)	E+T		
Visita 8	A los 180 días de la inclusión (D180)	E+T		
Visita 9	A los 210 días de la inclusión (D210)	E+T		
Visita 10	A los 240 días de la inclusión (D240)	E+T		
Visita 11	A los 270 días de la inclusión (D270)	E+T		
Visita 12	A los 300 días de la inclusión (D300)	E+T		
Visita 13	A los 330 días de la inclusión (D330)	E+T		
Visita 14	A los 365 días de la inclusión (D365)	E		

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Me comprometo a realizar las 14 visitas programadas para conocer el estado clínico de mi perro después del tratamiento con Ivomec®

Fecha:.....

Firma propietario

VºBº Veterinario Responsable

Anexo VI. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso de la SOCEPA de 2011 (Montoya *et al.*, 2011b).



Zaragoza  
5 - 8 Septiembre 2011

FIRST AUTOCHTHONOUS CASES OF *THELAZIA CALLIPAEDA*  
INFECTION IN CATS IN SPAIN

A. Montoya Matute<sup>1</sup>, D. Otranto<sup>2</sup>, MV, Vazquez<sup>3</sup>, A. James Romero<sup>1</sup>, L. Hernández Martínez<sup>1</sup>, R. Checa Herraiz<sup>1</sup>, D. Dado Ortiz<sup>1</sup>, G. Mir Corrales<sup>1</sup>

1.- Pto. Sanidad Animal -Facultad De Veterinaria (Ucm), Madrid, Spain

2.- Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari, Valenzano (Bari), Italy

3.- Clínica Veterinaria. El El Mundo Animal. Villanueva de la Vera, Cáceres, Spain

*Thelazia callipaeda* had been described as the causative agent of canine thelaziosis in Asia, but its presence has recently been reported in some European countries (Italy, France, Germany and Switzerland). On June 2010, a case of canine thelaziosis was reported in centralwestern Spain (La Vera region, Cáceres). In order to evaluate this emergent disease, an epidemiological study was performed in the same area. A family country farm where pigs, goats, chickens, dogs and cats were living together was sampled for *T.callipaeda* infection. All animals were subjected to ocular examination after administration of anaesthetic eye drops. In cases of *Thelazia* sp., eyeworms found were collected from the conjunctival sac of infected dogs using sterile cotton swabs. *T.callipaeda* was detected in two out of four cats and in three out of 4 dogs living on the same farm. One cat (5 years, female) showed ocular clinical signs (conjunctivitis and oedema) and the other was an asymptomatic kitten (4 months, male). Nematodes were identified as *T.callipaeda* by morphological keys and molecular analysis of sequences representing a portion of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene. The sequences characterised were identical to those of *T.callipaeda* haplotype1 previously reported in Europe. This study describes the first autochthonous case of *T.callipaeda* infection in cats from central western Spain (La Vera region). These results suggest that *T.callipaeda* has adapted in other carnivores and spread through this area, since it had been detected previously in dogs in the same area. Based on this finding and the high prevalence reported in this region veterinary practitioners are advised to include this parasite in the differential diagnosis of ocular diseases. In addition, while the potential public health risk to the human population in this area is still unknown it should also be considered.

Palabras clave: *Thelazia callipaeda*, thelaziosis, eyeworm, cat, dog, Spain



## Anexo VII. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso de AMVAC de 2012 (Bello *et al.*, 2012).

Madrid 8, 9, 10 y 11 de marzo de 2012

VetMADRID 2012-XXIX CONGRESO ANUAL

**TÍTULO:** SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ACTUAL DE LA THELAZIOSIS OCULAR CANINA EN ESPAÑA

**AUTOR(ES):** Bello Gavete A., Hernández Martínez L., Checa Herraiz R., Dado Ortiz D., Montoya Matute A., Benito Hidalgo M., Vázquez M., Villagrasa M., Miró Corrales G.

**CENTRO (S) DE TRABAJO:** Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, Avda. Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid.

### RESUMEN

**Objetivos:** Hasta el 2003, la infección por *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) se encontraba estrictamente limitada al continente asiático y a la antigua URSS, donde las principales especies afectadas eran el perro, el gato y el ser humano. Sin embargo, en la última década la localización y extensión geográfica de este parásito ha cambiado. En 2003, se refieren los primeros casos de thelaziosis canina en Italia y posteriormente, en Francia, Alemania y Suiza. En 2010, se documenta el primer caso de thelaziosis ocular en España en el Congreso Andaluz (Guisado y Saiz, 2010) y posteriormente se citan los primeros casos en el foco principal de La Vera (Montoya et al, 2011). El presente trabajo pretende reflejar la situación epidemiológica actual en la que se encuentra nuestro país con respecto a esta parasitosis emergente.

**Material y métodos:** Para la realización de este estudio, se llevó a cabo una exploración oftalmológica de cada uno de los animales incluidos, valorando la presencia de signos clínicos compatibles con esta parasitosis (conjuntivitis, edema, epifora, quemosis). A continuación, se realizó una exploración oftalmológica previa sedación con gotas oculares (Colircusí Anestésico® 0,50% a base de nafazolina hidrocloreuro y tetracaína hidrocloreuro), lo cual nos permitió una evaluación exhaustiva del saco conjuntival, principal ubicación de este parásito. En los animales positivos, los vermes fueron extraídos con pinzas, hisopo o *flushing*, y almacenamos en alcohol de 70°. Una vez retirados los vermes, se identificaron mediante las claves morfológicas existentes, así como por amplificación del fragmento del gen *cox 1*, determinándose todos ellos como haplotipo 1 de *T. callipaeda*, siendo éste el mismo que se ha detectado en el continente europeo (Otranto et al, 2003).

**Resultados:** A día de hoy, un total de 947 perros han sido examinados en diferentes provincias españolas. De los cuales, 487 (51,42%) han sido diagnosticados como positivos a esta nematodosis ocular, presentando signos clínicos aparentes (conjuntivitis, edema, epifora y quemosis) 138 del total de perros positivos (28,34%). Actualmente, existen varias provincias en las que se han documentado casos: Cáceres (considerado el foco inicial) (244 casos), Ávila (85 casos), Toledo (3 casos), Orense (135 casos), Salamanca (9 casos), Madrid (9 casos), Asturias (1 caso) y Vitoria (1 caso). Debemos destacar que tras examinar el historial de cada uno de los animales diagnosticados, encontramos una característica común, el historial de viajes, pudiendo establecer dos focos para dicha parasitosis (región de la Vera -zona limítrofe de Cáceres, Ávila y Toledo- y la provincia de Orense). Además, es necesario destacar la existencia de un caso autóctono reportado de esta parasitosis en un paciente humano (de Fuentes 2011, comunicación personal), lo cual demuestra el potencial zoonótico que presenta esta enfermedad.

**Conclusiones:** Nos encontramos ante un parásito con una gran capacidad de dispersión y potencial zoonótico. Basándonos en este aspecto, así como en el elevado aumento de casos diagnosticados frente a esta parasitosis en determinadas áreas geográficas, el riesgo potencial tanto para la población canina como humana debe ser considerado. Por tanto, resulta de gran importancia que los veterinarios conozcan esta nueva patología, no descrita con anterioridad al 2010, para que esta parasitosis quede incluida en la lista de diagnósticos diferenciales de enfermedades oculares.

### Bibliografía:

- Dorchies P, Chaudieu G, Siméon LA, Cazalot G, Cantacessi C, Otranto D : Reports of autochthonous eyeworm infection by *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs and cat from France. *Vet Parasitol* 2007, 149: 294-297.
- Guisado A, y Sanz F. 2010. Conjuntivitis en un perro por *Thelazia callipaeda*. 6º Congreso andaluz 5-6 nov.
- Malacrida F, Hegglin D, Bacciarini L, Otranto D, Nägeli F, Nägeli C, Bernasconi C, Scheu U, Balli A, Marengo M, Togni L, Deplazes P, Schnyder M: Emergence of canine ocular thelaziosis caused by *Thelazia callipaeda* in southern Switzerland. *Vet Parasitol* 2008, 157: 321-327.
- Miró G, Montoya A, Hernández L, Dado D, Vázquez MV, Benito M, Villagrasa M, Brianti E, Otranto D. *Thelazia callipaeda*: infection in dogs: a new parasite for Spain. *Parasite & Vectors*.2011, 27; 4:148
- Montoya A, Vázquez M.A, Pulido P, Hernández L, Dado D, Otranto D, Miró G. Thelaziosis ocular canina ¿Una parasitosis emergente en España? Consulta de Difusión Veterinaria178: 43-48. . 2011
- Otranto D, Traversa D: *Thelazia* eyeworm: an original endo- and ecto-parasitic nematode. *Trends Parasitol* 2005, 21: 1-4.
- Otranto D, Dantas-Torres F Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasit Vectors* 2010, 3:2. Rossi L, Bertaglia PP: Presence of *Thelazia callipaeda* Railliet & Henry, 1910, in Piedmont, Italy. *Parasitologia* 1989, 31: 167-172.

POSTER: X

**Anexo VIII. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso de AMVAC de 2012 (Hernández L. et al., 2012).**



**Primera denuncia de la infección por *Thelazia callipaeda* en gatos en España**

**Hernández Martínez L<sup>1</sup>, Montoya Matute A<sup>1</sup>, Checa Herrera R<sup>1</sup>, Dado Ortiz D<sup>1</sup>, Bello Gavete A<sup>1</sup>, Vázquez MV<sup>2</sup>, Benito Hidalgo M<sup>3</sup>, Villagrana M<sup>4</sup>, Ribas F<sup>5</sup>, San José J<sup>6</sup>, Miró Corrales G<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Spain. <sup>2</sup> Clínica Veterinaria "El Mundo Animal", Villanueva de la Vera, Cáceres, Spain. <sup>3</sup> Clínica veterinaria "Candeleda", Candeleda, Ávila, Spain. <sup>4</sup> Centro oftalmológico veterinario Goya, Madrid, Spain. <sup>5</sup> Clínica veterinaria "San Jorge", Sant Jordi Ibiza, Spain. <sup>6</sup> Centro veterinario "La Villa", Avilés, Asturias, Spain.

**INTRODUCCIÓN**

*Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) es el agente etiológico de la thelaziosis canina, descrita inicialmente en Asia y, recientemente en Europa (Italia, Francia, Alemania, Suiza y España). En noviembre de 2010 se describió el primer caso clínico en nuestro país (Guísado y Sanz., 2010). Hasta el momento en España se han registrado un total de 487 casos de thelaziosis canina considerándose endémica en dos provincias: Cáceres (norte) (Miró et al., 2011) y Orense (noroeste), citándose prevalencias de más del 50% en dichas zonas. El objetivo del presente estudio es conocer la situación actual de la infección por *T. callipaeda* en gatos y sus implicaciones epidemiológicas.



**MATERIAL Y MÉTODOS**

Durante el año 2011 se realizó la exploración oftalmológica para la búsqueda activa de *T. callipaeda* en gatos procedentes de áreas geográficas en las que se estaba realizando el estudio epidemiológico de la thelaziosis canina.

En el presente estudio se incluyeron 27 gatos que vivían en zonas geográficas endémicas de thelaziosis canina, o bien gatos que acudían a las clínicas veterinarias con signos oculares compatibles con la infección por *T. callipaeda*.

A todos los gatos se les realizó una exploración oftalmológica exhaustiva, tras la administración de un anestésico oftálmico: Colircusí Anestésico 0,50%\* (a base de nafazolina hidrocloreuro y tetracaína hidrocloreuro). Los vermes observados se recogieron mediante hisopo, pinzas o *flushing* y mantenidos en alcohol de 70° hasta su posterior análisis en el laboratorio.



Larvas en el interior de una hembra de *Thelazia* (40x) Detalle del extremo distal de un macho de *Thelazia* (40x) Extremo anterior de un macho de *Thelazia* y detalle de la cutícula serrada (40x)

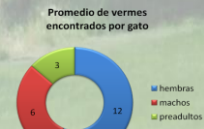
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Hasta el momento, en el periodo comprendido entre mayo y diciembre de 2011, se detectó la presencia de *T. callipaeda* en un total de 27 gatos. De los cuales, 17 procedían de Cáceres, 8 de Ávila, uno de Asturias y uno de Ibiza. No obstante, cabe resaltar que el gato muestreado en Asturias había pasado un periodo estival en Orense y el de Ibiza en Cáceres; ambas zonas endémicas de thelaziosis canina en España. Este estudio es el primero en España en denunciar la presencia de *T. callipaeda* en la población felina; lo que coincide con estudios previos en los que ya se había detectado la presencia de *Thelazia* en gatos de Francia (Dorchies et al., 2007) e Italia (Otranto et al., 2003). En el sur de Italia también se ha confirmado la infección por *T. callipaeda* en gatos monteses (*Felis silvestris*), así como en otros carnívoros silvestres (Otranto et al., 2009)

Tras la exploración oftalmológica de los 27 gatos positivos, se recolectaron un total de 398 vermes, observándose 53 vermes en el gato con la mayor carga parasitaria y 7 en el que presentó una carga más baja.

Mediante observación microscópica se determinó que todos los vermes pertenecían al género *Thelazia*, siguiendo las claves de identificación descritas por Otranto et al., (2003). Posteriormente, fueron identificados mediante la amplificación del fragmento del gen *cox 1*, determinándose todos ellos como haplotipo 1 de *T. callipaeda*, siendo éste el mismo que se ha detectado en el continente europeo (Otranto et al., 2003).

Respecto a las variables epidemiológicas estudiadas, no se observaron diferencias significativas respecto a la edad y el sexo. Cabe destacar que en la mayoría de los gatos parasitados (70%) se observaron signos clínicos oculares compatibles con thelaziosis, siendo los más predominantes conjuntivitis, edema y epifora. No obstante, es necesario hacer un estudio más exhaustivo en una población felina más amplia para poder establecer las variables epidemiológicas implicadas en esta nueva parasitosis del gato.



**CONCLUSIONES**

- Estos resultados sugieren que *T. callipaeda* se ha adaptado a diferentes carnívoros (perros y gatos, por el momento) y se disemina rápidamente por el oeste de España.
- La thelaziosis canina y felina debe incluirse en el diagnóstico diferencial de patologías oculares, tanto en animales que viven en las zonas endémicas citadas (Cáceres y Orense), como en aquellos que hayan viajado a las mismas.
- Cabe destacar el papel zoonótico de este parásito, lo que representa un nuevo interés en salud pública.

**BIBLIOGRAFÍA**  
 - Borchies P, Chaudieu G, Simón LA, Cazalot G, Cantacessi C, Otranto D. 2007. Reports of autochthonouseyeworm infection by *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs and cat from France. *Vet Parasitol*, 149:294-297.  
 - Guísado A, y Sanz F. 2010. Conjuntivitis en un perro por *Thelazia callipaeda*. 6º Congreso andaluz 5-6 nov.  
 - Miró G, Montoya A, Hernández L, Dado D, Vázquez MV, Benito M, Villagrana M, Brianti E, Otranto D. 2011. *Thelazia callipaeda*: infection in dogs; a new parasite for Spain. *Parasit Vectors*. 27:41-48.  
 - Otranto, D, Ferrogliá E, Lia, R.P, Traversa, D, Rossi, L. 2003. Current status and epidemiological observations of *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in dogs, cats and foxes in Italy: a "coincidence" or a parasitic disease of the Old Continent? *Vet. Parasitol* 116, 315-325.  
 - Otranto D, Dantas-Torres F, Mallia E, DiGeronimo P, Brianti E, Testini G, Traversa D, Lia R. 2009. *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in wild animals: Report of new host species and ecological implications. *Vet Parasitol*. 166:262-267

## Anexo IX. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso de la SOCEPA de 2013 (Montoya *et al.*, 2013b).

COMUNICACIONES ORALES



**Congreso de la Sociedad Española de Parasitología**  
Encuentro Internacional de Parasitólogos de España, Francia, Italia y Portugal  
Gran Canaria 17 - 20 de Septiembre de 2013

CO-TR.6

### ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA EFICACIA DE LA IVERMECTINA Y LA MOXIDECTINA EN EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN EN PERROS CON INFECCIÓN NATURAL POR *THELAZIA CALLIPAEDA*

Montoya, A.<sup>1</sup>, Hernández, L.<sup>1</sup>, Checa, R.<sup>1</sup>, Gálvez, R.<sup>1</sup>, Benito, M.<sup>2</sup>, Carrasco, J.<sup>2</sup>, Canorea, I.<sup>1</sup>, Miró, G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Clínica veterinaria Candeleda, Ávila, Spain

Autor responsable (correo-E): amontoya@ucm.es

La thelaziosis canina es una parasitosis emergente en nuestras latitudes que afecta principalmente a cánidos domésticos y silvestres, pero que puede afectar a otros mamíferos, incluido el ser humano. De ahí la importancia de realizar un adecuado tratamiento quimioproláctico para reducir la prevalencia, y en consecuencia, el riesgo de esta zoonosis en zonas endémicas. El tratamiento de elección debe incluir la retirada manual de los parásitos y la posterior aplicación de un nematocida eficaz. El objetivo del estudio fue comparar la eficacia de tres tratamientos (moxidectina 1% (gotas oculares), moxidectina 10% (sol. inyectable) e ivermectina 1% (pomada ocular) en perros con infección natural por *T. callipaeda*. El estudio se desarrolló en una colectividad canina localizada en Madrigal de la Vera (Cáceres), zona endémica de thelaziosis canina. Una vez comprobado que todos los perros (n=49) eran positivos a la infección por *T. callipaeda*, se distribuyeron al azar en tres grupos homogéneos. Tras la retirada manual de los vermes, se aplicó el principio activo correspondiente: Grupo 1 (n=16): moxidectina 1% por instilación ocular; Grupo 2 (n=16): ivermectina 1% en pomada y Grupo 3 (n=17): moxidectina 10% (s.c.). Se realizaron revisiones clínicas mensuales a todos los perros y en el caso de los grupos 1 y 2 se repitió el tratamiento, mientras que en el grupo 3 sólo se volvieron a tratar en caso de detectar la presencia de vermes. Los tres tratamientos mostraron una buena eficacia nematocida; mientras que la eficacia profiláctica fue mayor en los animales del Grupo 2 (75-100%) respecto al Grupo 1 (30-87,5%). Asimismo, los animales tratados con moxidectina al 10% fueron negativos durante un periodo mínimo de 7 meses post-tratamiento, mostrando una elevada eficacia como preventivo. Posteriores estudios, con más animales y durante un periodo más prolongado, permitirán ajustar las recomendaciones para mejorar el control de esta zoonosis emergente.

## Anexo X. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso de la SOCEPA de 2015 (Marino *et al.*, 2015).



I5

### Actualización sobre la dispersión de la infección por *Thelazia callipaeda* en España

Marino V<sup>1</sup>, Montoya A<sup>1</sup>, Checa R<sup>1</sup>, Gálvez, R<sup>1</sup>, Miró, G<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo Epicontrol-Carnívoros. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

La infección por *Thelazia callipaeda* en el perro y el gato se considera una parasitosis emergente que fue denunciada en España por primera vez a finales de 2009 en la provincia de Cáceres (La Vera). Desde entonces los casos citados han ido en aumento; considerándose las provincias de Cáceres y Orense como zonas endémicas con prevalencias superiores al 40% en la población canina y del 20% en la población felina.

La importancia de esta nematodosis, además de porque provoca en los carnívoros domésticos lesiones oculares crónicas de distinta consideración, radica en: su carácter zoonótico, su rápida difusión, no solo en nuestro país sino en otros países de la Unión Europea (Italia, Suiza, Alemania, Francia, Portugal, Bélgica, Rumania y Grecia) y la amplia gama de hospedadores silvestres que pueden actuar como reservorios (zorro, lobo, gato montés, liebre y garduña), lo que ha despertado un gran interés en la comunidad científica.

Hasta el momento en España, hemos recogido información completa sobre nuevos casos de thelaziosis ocular canina y felina en otras muchas áreas geográficas: Asturias (2 perros y 1 gato), Ávila (>90 perros y 8 gatos), Barcelona (5 perros), Cádiz (1 perro), Gerona (1 perro), Granada (11 perros), Guipúzcoa (1 perro), León (2 perros), Lérída (2 perros), Madrid (>40 perros y 1 gato), Salamanca (9 perros), Segovia (3 perros), Sevilla (1 perro), Toledo (6 perros), Valencia (4 perros), Vitoria (1 perro), e incluso las Islas Baleares (1 perro y 1 gato). La presencia del parásito en estas áreas indica la facilidad de dispersión del mismo. Y, aunque en general, los casos detectados corresponden a animales que han viajado a zonas endémicas; recientemente hemos recogido información sobre casos de thelaziosis en animales que no habían viajado a zonas endémicas: Barcelona (5), Granada (11), León (2), Lérída (2), Madrid y Segovia (Sierra de Guadarrama) (15). Son necesarios futuros estudios en estas áreas geográficas para evaluar la posible presencia del vector y demostrar su competencia. Hasta el momento, hemos recolectado 81 ejemplares de *Phortica variegata* en la región de La Vera, aunque por disección no se detectó la presencia de larvas de *T. callipaeda*; siendo necesarias nuevas capturas y el análisis molecular de los especímenes recolectados.

**Anexo XI. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso de la AVEPA de 2016 (Marino *et al.*, 2016).**

## SITUACIÓN DE LA THELAZIOSIS EN ESPAÑA: ¿QUÉ HA PASADO EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS?

**Valentina Marino<sup>1</sup>, Ana Montoya<sup>1</sup>, Rocio Checa<sup>1</sup>, Rosa Galvez<sup>1</sup>, Guadalupe Miró<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. Grupo Epicontrol-Carnívoros

### OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo del estudio fue conocer la evolución de la thelaziosis canina en España en el periodo comprendido entre 2010 y 2016. La infección por *Thelazia callipaeda* se considera una parasitosis emergente que fue denunciada en España por primera vez a finales de 2009 en la provincia de Cáceres (La Vera) [1,4] y en Andalucía en un perro que procedía del mismo sitio [2]. La importancia de esta nematodosis radica en que provoca en los carnívoros domésticos lesiones oculares crónicas de distinta consideración si no se instaura un tratamiento específico (Fig. 1 y 2). Su carácter zoonótico, se han descrito tres casos de thelaziosis humana [5], así como rápida difusión y la amplia gama de hospedadores silvestres que pueden actuar como reservorios (zorro, lobo, gato montés, liebre y garduña), han despertado un gran interés en la comunidad científica en toda Europa.

### RESULTADOS

En España, hemos recogido información completa sobre nuevos casos de thelaziosis ocular canina y felina en diversas áreas geográficas: Asturias (2 perros y 1 gato), Ávila (91 perros y 8 gatos), Barcelona (5 perros), Cádiz (1 perro), Gerona (1 perro), Granada (11 perros), Guipúzcoa (1 perro), León (2 perros), Lérida (2 perros), Madrid (51 perros y 1 gato), Salamanca (9 perros), Segovia (3 perros), Sevilla (1 perro), Toledo (6 perros), Valencia (4 perros), Vitoria (1 perro), e incluso Bilbao (1 perro), las Islas Baleares (1 perro y 1 gato), La Coruña (4 perros) y Tarragona (10 perros). La presencia del parásito en estas áreas indica la amplia dispersión del mismo. Y, aunque en general, los casos detectados corresponden a animales que han viajado a zonas endémicas; recientemente hemos recogido información sobre casos de thelaziosis en animales que no habían viajado a zonas endémicas: Barcelona (5), Granada (11), León (2), Lérida (2), Madrid y Segovia (Parque Nacional del Guadarrama) (18). En particular en la provincia de Madrid hemos detectado varios casos autóctonos en la zona del El Escorial (23) (Fig. 5). Se recolectaron además 81 ejemplares de *Phortica variegata* en la región de La Vera, 1396 en El Escorial, 144 en Miraflores y 8 en la Granja (Segovia).

### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio epidemiológico se realizó incluyendo muestreos en diferentes localizaciones a lo largo de toda la Península. Una primera parte, se llevó a cabo en las provincias donde se describieron los primeros casos de thelaziosis (La Vera y Orense). Todos los animales fueron sometidos al mismo protocolo que consistió en la toma de datos y cumplimentación de una ficha técnica diseñada para el estudio (Fig. 3); una exploración oftalmológica exhaustiva tras la instilación de un anestésico oftálmico (clorhidrato de tetracaina y clorhidrato de nafazolina, Colirius anestésico® 0,05%). En caso de observar vermes, estos se recogieron con ayuda de un hisopo (Fig. 4) y se mantuvieron en alcohol de 70°. Los vermes se identificaron morfológicamente en el laboratorio como ejemplares de *Thelazia callipaeda* siguiendo claves de identificación morfológicas [6]. Para la segunda parte del estudio se dividió el mapa de España en 55 cuadrículas. A través de una encuesta telefónica y de la colaboración de varias clínicas veterinarias de toda España, se instauró una red de "veterinarios centinela" que permitió detectar los casos de estas parasitosis a lo largo de la península. Los datos recolectados en la encuesta fueron: la presencia de signos clínicos, otros casos positivos de thelaziosis en la zona, el número de casos observados por año, el historial de viajes del animal. En muchas ocasiones fue posible la identificación morfológica de estos parásitos gracias a la recolección, el envío y el examen microscópico.

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

No se encontraron larvas de *T. callipaeda* en la disección de las drosófilas capturadas por tanto son necesarios futuros estudios en estas áreas geográficas para evaluar la presencia del artrópodo vector y demostrar su competencia vectorial. Además será relevante el análisis molecular de los especímenes recolectados [7]. Dado su elevada dispersión y carácter zoonótico es importante destacar la necesidad de incluir esta parasitosis en el diagnóstico diferencial de procesos oculares, especialmente en animales que viven o han viajado a las zonas geográficas descritas.

### BIBLIOGRAFÍA

- Miró G, Montoya A, Hernández L, Cado D, Vázquez M, Sento M, et al. *Thelazia callipaeda*: Infection in dogs: a new parasite for Spain. *Parasit. Vectors*. 2011;4:148.
- Quisado A, Sero F. Conjuntivitis en un perro por *Thelazia* spp. 6º Congreso Andaluz de Veterinarios. Málaga, 2010.
- Marino V, Montoya A, Checa R, Galvez R, Miró G. 2015. Actualización sobre la dispersión de la infección por *Thelazia callipaeda* en España. XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA). Vitoria, 23-25 Julio (poster).
- Montoya A, Vázquez MV, Pulido P, et al. *Thelaziosis* ocular canina. ¿Una parasitosis emergente en España? *Consulta Clínica Vet*. 2011;175:43-48.
- Fuentes I, Morbes J, Saiz JM, Latrobe S, García T, Otranto D. *Thelaziosis* in humans, a zoonotic infection, Spain, 2011. *Emerg. Infect. Dis*. 2012;18:2073-4.
- Otranto D, Liu RP, Tevares D, Garrabou S. *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelazidae) of carnivores and humans: morphological study by light and scanning electron microscopy. *Parasitologia*. 2003;45:126-33.
- Otranto D, Tevares D, De Luca F, Hu M, Sharma S, Gasser RB. Analysis of genetic variability within *Thelazia callipaeda* (Nematode: Thelazidae) from Europe and Asia by sequencing and mutation scanning of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene. *Mol. Cell. Probes*. 2005;19:306-13.

**Anexo XII. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso ISoWiF de 2017 (López-Beceiro *et al.*, 2017).**

TOPIC C- WILD FAUNA DISEASES UNDER ONE HEALTH APPROACH  
ISoWiF2017  
POSTER PRESENTATIONS



**Impact of the dispersion of *Thelazia callipaeda* infection in wild animals: reporting cases in 34 foxes from Lugo and Ourense (Galicia-NW Spain)**

López-Beceiro, A.M.<sup>1</sup>, Marino, V.<sup>2</sup>, Checa, R.<sup>2</sup>, Barrera, J.P.<sup>2</sup>, Montoya, A.<sup>2</sup>, Gálvez, R.<sup>2</sup>,  
Fidalgo, L.E.<sup>1</sup>, Miró, G.<sup>2</sup>

1- Dpto. Anatomy, Animal Production and Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Faculty, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Spain. [anam.lopez.beceiro@usc.es](mailto:anam.lopez.beceiro@usc.es); Presenting author: [luis.fidalgo@usc.es](mailto:luis.fidalgo@usc.es)

2- Department of Animal Health, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, Spain. [gmiro@ucm.es](mailto:gmiro@ucm.es); [rocio.checa@vet.ucm.es](mailto:rocio.checa@vet.ucm.es); [amontoya@vet.ucm.es](mailto:amontoya@vet.ucm.es)

**Abstract**

The aim of this communication is to report the occurrence of *Thelazia callipaeda* infection in foxes from Northwestern Spain. Cases of thelaziosis in wild animals have been described for the first time in 46 foxes in Italy. Since then, other cases have been described in Switzerland, Spain, Portugal, Bosnia and Herzegovina and Romania.

From January to February of 2016 (n=241) and 2017 (n=144) a total of 385 carcasses of red foxes (*Vulpes vulpes*) were examined from 46 municipalities of Galicia where canine thelaziosis is highly prevalent. At necropsy, all foxes were subjected to an ocular examination few hours after death. *Thelazia* spp. eyeworms were collected from the conjunctival sac of infected foxes using sterile cotton swabs or flushing with physiological saline solution. Out of 385 examined animals, 34 (8.83%) results positive by *T. callipaeda* infection. Positive foxes were detected only from 9 municipalities, located in the province of Lugo (6) and Ourense (3). This is the first report of the presence of *T. callipaeda* in foxes from NW Spain.


In the last few years many authors have described the importance of the wild cycle of this ocular nematode in the dispersion of the illness. Although other wildlife species were demonstrated to act as definitive hosts for *T. callipaeda*, foxes are probably the most suitable wild carnivores due to their peri-urban habits, which may favor a closer contact with the vector.

**Key words:** *Thelazia callipaeda*; foxes; NW Spain; emerging disease

Acknowledgements: Wildfauna Recovery Centers of Galicia, Dirección Xeral de Patrimonio Natural (Xunta de Galicia, Spain).


**Anexo XIII. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso de la AVEPA de 2018 (Marino *et al.*, 2018c).**

## A QUESTIONNAIRE-BASED SURVEY ABOUT CURRENT SITUATION OF *THELAZIA CALLIPAEDA* INFECTION IN SPAIN: UPDATE OF REPORTED CASES.



Marino V<sup>1</sup>, Gálvez R<sup>2</sup>, Montoya A<sup>1</sup>, Checa R<sup>1</sup>, Sarquis J<sup>1</sup>, Barrera JP<sup>1</sup>, Miró, G<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Health Department, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, Madrid, Spain



The aim of this study was to get new information on the dispersion of *Thelazia callipaeda* infection in Spain. To evaluate its spread throughout Spain, an epidemiological study was carried out. To achieve this purpose, an update of reported canine and feline cases of thelaziosis and a questionnaire-based survey designed in 2018 were done.

**Materials and Methods**

Survey of 10 questions → 600 questionnaires sent




Fig. 1. Survey of 10 questions

These results were added to the published data reported from 2010 to 2015, thus updating the dissemination scenario of thelaziosis in Spain. Using the data of cases reported by our investigation group and the results obtained through the designed questionnaire, we have drawn an updated map of points, to illustrate the location of all cases found. The presence of *Thelazia* spp infection in these areas indicates that this parasite can easily disperse through new geographical areas.

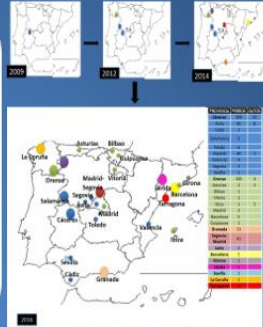


Fig. 3. Cases reported by our investigation group (AVEPA 2016)

CLINICAL SIGNS :







Categories	Description	Picture
Stage 1	Without clinical signs.	
Stage 2	Light conjunctivitis.	
Stage 3	Chronic follicular conjunctivitis.	
Stage 4	Complicated follicular conjunctivitis with marked hyperplasia of the third eyelid lymphoid tissue, chemosis and purulent ocular discharge.	
Stage 5	Chronic follicular conjunctivitis with blepharitis.	
Stage 6	Chronic follicular conjunctivitis with corneal ulcer.	

Fig. 2. Clinical signs (Fernandez 2016)

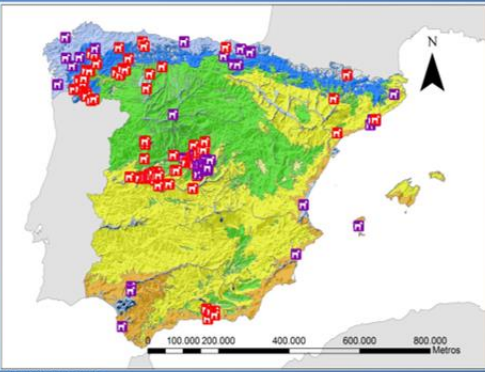


Fig. 4. Updated map of points

**CLINICAL SIGNS**

Fig. 5. Clinical signs reported in the survey

600 questionnaires sent

Reply rate of only 23.5% (141/600)

7.1% (10/141) did not know the *T. callipaeda* parasite

54.6% (77/141) had had cases in their practice


38.3% (54/141) had not had cases in their practice

**Conclusions**

*Thelazia callipaeda* has had a high dispersion in the last few years. Given this information and considering its zoonotic threat it is important to highlight the need to include this parasitosis in the differential diagnosis of ocular processes, especially in animals that live or have travelled to the geographical areas aforementioned. Although considerable efforts have been made to control the spreading of this ocular disease, its incidence continues to increase in endemic and new autochthonous areas due to the coincidence of the arthropod vector and infected animals.

**Bibliography**

1. Olivares O, Devesa Torres V, Mallat, et al. *Thelazia callipaeda* (Dipterida: Thelazidae) in wild animals. Report of new host species and ecological implications Parasitol 2009;139:262-7.
2. Gálvez R and Sarquis J. Comorbilidad en un perro por *Thelazia callipaeda* (Diptera: Thelazidae). *Revista de Medicina Veterinaria* 2010.
3. Montoya A, Vaz, Fernández L, Diedo D, Olivares O, Miró G. *Thelazia callipaeda* (Diptera: Thelazidae) en España. *Revista de Medicina Veterinaria* 2011;170:43-8.
4. Fernández L, Montoya A, Checa R, et al. Primera denuncia de la infección por *Thelazia callipaeda* en gatos en España. *Revista de Medicina Veterinaria* 2012.
5. Fuentes J, Muñoz J, Sarquis JM, Latorre S, Sarquis J, Olivares O. *Thelazia callipaeda* (Diptera: Thelazidae) en un perro. *Revista de Medicina Veterinaria* 2013;172:207-9.
6. Sarquis JM, Muñoz J, Sarquis JM, Latorre S, Sarquis J, Olivares O. *Thelazia callipaeda* (Diptera: Thelazidae) en un perro. *Revista de Medicina Veterinaria* 2013;172:207-9.
7. Miró G, Montoya A, Fernández L, et al. *Thelazia callipaeda* (Diptera: Thelazidae) en un perro. *Revista de Medicina Veterinaria* 2011;170:43-8.
8. Marino V, Montoya A, Checa R, Gálvez R, Sarquis J, Miró G. Situación de la thelaziosis en España. *Opiniones y avances en los últimos 5 años* (Iberian Veterinary Conference European Veterinary Conference, 13 National Congress of AVEPA, Granada, 2014).
9. Marino V, Gálvez R, Calafate, et al. Detección de *Thelazia callipaeda* en Phorridae (Diptera) y dispersión de caninos thelaziosis a new areas in Spain. *Parasitology* 2018;111:1129.



**MADRID 2018**  
18-20 October 2018 - Spain

**Anexo XIV. Tabla Suplementaria Marino *et al.* (2021a): Demographics and clinical data for dogs testing positive for *Thelazia callipaeda* infection during prophylactic treatment.**

	Positive dogs	Weight	Sex	Site	Date	Treatment day	<i>T. callipaeda</i> parasites	Eye
Group A	Dog 1	2	Male	1	03/04/2019	90	1 female adult	Right eye
	Dog 2	3	Male	1	03/04/2019	180	4 adults	na
	Dog 3	3	Male	2	22/07/2017	240	1 adult	na
	Dog 4	2	Female	2	25/09/2017	330	Positive <sup>a</sup>	Left eye
	Dog 5	2	Female	2	18/09/2017	240	Positive <sup>a</sup>	Both eyes
Group C	Dog 6	1	Male	1	04/10/2017	90	1 adult	na
	Dog 7	1	Male	1	11/07/2019	150	2 L3s	Left eye
	Dog 8	3	Male	1	15/11/2017	180	Positive <sup>a</sup>	na
Group D	Dog 9	2	Female	1	29/08/2018	30	2 L3s	Both eyes
	Dog 10	3	Female	1	29/08/2018	30	5 L3s	Both eyes
	Dog 11	2	Male	1	15/11/2017	60	Positive <sup>a</sup>	na
	Dog 12	2	Male	1	04/07/2018	210	9 L3s	na

<sup>a</sup>Missing data on parasite stage

Na, not available

**Anexo XV. Comunicación realizada por nuestro equipo de investigación al Congreso de la AMVAC de 2021 (Marino *et al.*, 2021c).**



XXXVIII CONGRESO  
AMVAC  
Medicina y Cirugía  
de la Reproducción  
y Sistema Urinario

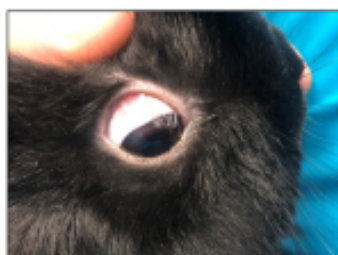
**Primeros casos descritos de la infección por *Thelazia callipaeda* en dos conejos de compañía (*Oryctolagus cuniculus*) en España**

Marino V., Barbero Rodríguez S., Montoya Matute A., Gálvez Esteban R., Miró G.

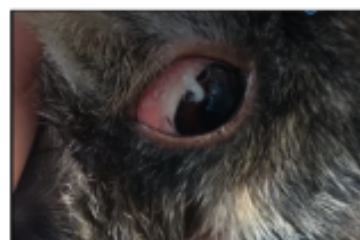
### INTRODUCCIÓN

La thelaziosis es una infección ocular causada por nematodos pertenecientes al género *Thelazia* (Orden Spirurida, Familia Thelaziidae), comúnmente conocidos como “vermes oculares”. Los casos de infección por *Thelazia callipaeda* en leporídeos en Europa son escasos. Aquí se describen por primera vez dos casos de infección en conejos de compañía en España.

### CASOS CLÍNICOS



- mayo 2019
- Riaza (Segovia)
- Imidacloprid (40 mg) + moxidectina (4 mg)



- noviembre 2020
- Madrid, pero había veraneado en Sanabria (Zamora)
- Ivermectina s.c. (0,4 mg/kg)

23 parásitos adultos (15 hembras y 8 machos)

La identificación morfológica de los parásitos se realizó en el laboratorio de *Pet Parasite Lab* de la UCM, utilizando las claves de identificación descritas por Otranto *et al.* (2003)<sup>1</sup>.

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este es la primera descripción de la infección por *T. callipaeda* en conejos de compañía en España y en Europa. Los conejos infectados descritos en este estudio se encontraron en dos áreas geográficas donde la thelaziosis canina y felina es endémica<sup>2</sup>, confirmando el elevado riesgo de infección presente en numerosas áreas de nuestro país.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Otranto D, Uja RP, Traversa D, Giannetto S. *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) of carnivores and humans: morphological study by light and scanning electron microscopy. *Parassitologia*. 2003;45(3-4):125-33.
2. Marino V., Gálvez R, Montoya A, Mascuñán C, Hernández M, Barrera JP, et al. Spain as a dispersion model for *Thelazia callipaeda* eyeworm in dogs in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*. 2020;175: 104883.



