



La leishmaniosis en la provincia de Lleida y Andorra. Estudio de los factores que influyen en la densidad de los vectores y en la prevalencia de la leishmaniosis canina

J. Cristina Ballart Ferrer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries



LA LEISHMANIOSIS EN LA PROVINCIA DE LLEIDA Y
ANDORRA. ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE
INFLUYEN EN LA DENSIDAD DE LOS VECTORES Y
EN LA PREVALENCIA DE LA LEISHMANIOSIS
CANINA

Memoria presentada por **J. Cristina Ballart Ferrer** para optar al
grado de Doctor por la Universitat de Barcelona en el marco del
programa de Doctorado *Recerca, Desenvolupament i Control de
Medicaments*.

Directora de tesis: Dra. Montserrat Gállego Culleré

Barcelona, 2012

Montserrat Gállego Culleré, Doctora en Farmacia y Profesora Titular de la Unitat de Parasitologia del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Universitat de Barcelona.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “La leishmaniosis en la provincia de Lleida y Andorra. Estudio de los factores que influyen en la densidad de los vectores y en la prevalencia de la leishmaniosis canina”, presentado por la licenciada en Biología Sanitaria J. Cristina Ballart Ferrer, ha sido realizado en la Unitat de Parasitologia del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Universitat de Barcelona bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Barcelona, 4 de Diciembre de 2012

Dra. Montserrat Gállego Culleré
Directora de la Tesis Doctoral

J. Cristina Ballart Ferrer
Doctoranda

*“Per l’amor, la salut
i les roses!”*

Agraïments

En primer lloc, a la directora Montserrat Gállego Culleré, Professora Titular de la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, per haver dipositat la seva confiança en mi, haver-me donat aquesta oportunitat i ajudat durant tot el procés d'elaboració d'aquest treball. Gràcies per obrir-me les portes de casa teva.

A la Dra. Montserrat Portús Vinyeta, Catedràtica emèrita de la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, per la seva contribució a la revisió de les diferents publicacions així com de la resta d'aquest treball, tant com per les seves valuoses aportacions.

Als membres del tribunal que han de jutjar el meu treball, Drs. Patrick Bastien, Joaquina Martín-Sánchez i Ricardo Molina, per haver acceptat estar en el mateix.

Al Dr. Bernard Pesson, del Laboratori de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Strasbourg, per tot el coneixement que m'ha transmès sobre la matèria, per la seva paciència i bon humor, i per haver-me cuidat tant durant la meva estada al seu departament. Per aquesta, vam gaudir d'una "Ayuda para la obtención de la Mención Europea en el Título de Doctor" del Ministerio de Educación y Ciencia (2010).

Al Dr. Christophe Ravel i a tots els companys del Laboratori de Parasitologia del Centre Nacional de Referència de Leishmaniosis de la Facultat de Medicina de Montpellier, per haver-me acollit. L'estada va estar finançada per la Fundació Universitària Agustí Pedro i Pons a través d'un "Ajut per a la realització de projectes fora de Catalunya" (2010).

A tots aquells que formen part de la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia, especialment a la Magda Alcover, la Silvia Tebar, les dues Albes, la Soledad Castillejo i les Dres. Roser Fisa i Cristina Riera. I un record especial per en Joan Carles Casanova, feliç d'haver compartit petits moments amb ell i desitjant que hagi trobat la calma allà on es trobi. A l'Albert Picado i al Xavier Castells, que m'han ajudat amb els números, sense ells aquesta feina no hagués estat possible. Sense oblidar-me de la Irene Guerrero, la Maria Rubio i l'Anna Lanau, per la seva gran ajuda durant les campanyes de captura. En definitiva, a tots els que han col·laborat d'alguna manera en l'elaboració d'aquesta Tesi Doctoral.

A tots els de components del projecte EDEN, especialment a la Rosa Gálvez, per animar-me a seguir sempre endavant, així com al Sergio Barón i les nostres tapes per Granada. Al Josep Maria de Moner, veterinari de Sort, per la seva ajuda durant el treball de camp, la seva

simpatia i ganes de treballar. I amb molt entusiasme, agrair a tots aquells veterinaris i amos de gossos que m'han ajudat i han confiat en nosaltres fent-me veure que tota aquesta feina servia per alguna cosa que anava més enllà de les portes d'un departament.

Per la realització del treball recollit en la memòria de la Tesi Doctoral s'ha gaudit de finançament per part dels següents projectes i institucions: “Influencia de los cambios climático y medio-ambiental sobre dos focos de leishmaniosis en España (Andalucía y Cataluña)” del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías medioambientales, Ministerio de Ciencia y Tecnología (Projecte AGL2004-06909-C02-01/GAN). I “Emerging Diseases in a changing European eNvironment (EDEN)” del VI Programa Marc de la Unió Europea Sustainable development, global change and ecosystems. Comunitat Econòmica Europea. (Projecte 400764/GOCE-CT-2003-010).

I per últim, molt especialment vull donar les gràcies a tota la meva família, sobretot als meus pares i germans, que sempre m'han recolzat i m'han ajudat en TOT allò que necessitava, així com a tots els meus amics, d'aquí i d'allà, que sempre han estat al meu costat d'una manera o altre: “Amics meus, per poder riure junts fins a l'infinit!”. A la meva gran amiga Patri i a les meves nenes, que m'han fet costat en els moments més difícils. Al Francesc i la Mercè, sempre al peu del canó! Al Dani i la Pepa, als que adoro. Al teatre, que m'ha donat tantes coses bones i tanta vitalitat per tirar endavant amb tot.

Al Tano, el meu mariner, per tot l'amor que m'ha donat. “Una que t'estima i ho farà sempre”.

I a la vida, simplement.

ÍNDICE GENERAL	Pág.
1. Introducción	1
1.1. La leishmaniosis	3
1.1.1 La leishmaniosis desde un punto de vista global	3
1.1.1.1 La leishmaniosis humana	6
1.1.1.2 Los reservorios de la leishmaniosis	7
1.1.1.2.1 La leishmaniosis canina	8
1.1.1.3. Los flebotomos vectores de la leishmaniosis	11
1.1.2. Control de la leishmaniosis	15
1.1.3. Emergencia y/o reemergencia de la leishmaniosis en Europa	17
1.1.3.1. La leishmaniosis en España	18
1.1.3.1.1 La leishmaniosis humana en España	19
1.1.3.1.2 Los reservorios de la leishmaniosis en España	20
1.1.3.1.2.1 La leishmaniosis canina en España	21
1.1.3.1.3 Los flebotomos vectores en España	21
1.2. Los Sistemas de Información Geográfica (SIG)	22
1.2.1 Utilidad de los SIG en el estudio epidemiológico de la leishmaniosis	23
1.3. Justificación del proyecto	24
2. Objetivos y plan de trabajo (“Objectives and work plan”)	27
2.1 Objetivos (“Objectives”)	29
2.2 Plan de trabajo (“Work plan”)	29
3. Material y Métodos	31
3.1 Área de estudio	33
3.2 Estudio entomológico	35
3.2.1 Captura de flebotomos	35
3.2.2 Recolección, fijación, montaje e identificación	36
3.3 Estudio sobre la leishmaniosis canina	36
3.3.1 Cuestionario veterinario sobre la leishmaniosis canina	36
3.3.2 Estudio serológico de los perros. Recogida y pruebas diagnósticas	37
3.4 Recogida y origen de los datos	37

3.5 Tratamiento estadístico	38
4. Resultados	41
Capítulo 1. “Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain”	43
Capítulo 2. “Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: first finding of <i>P. perniciosus</i> and wide distribution of <i>P. ariasi</i> ”	51
Capítulo 3. “First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study”	61
Capítulo 4. “Environmental and climatic factors influencing the distribution of <i>Leishmania infantum</i> vectors, <i>Phlebotomus ariasi</i> and <i>Phlebotomus perniciosus</i> , in Northeast Spain (Lleida, Catalonia)”	77
5. Discusión	123
5.1 Presencia de los flebotomos vectores de la leishmaniosis canina en la provincia de Lleida y en Andorra. Factores que influyen en su densidad e importancia epidemiológica	126
5.2 Presencia de la leishmaniosis canina en la provincia de Lleida. Importancia epidemiológica	130
6. Conclusiones (“Conclusions”)	137
7. Bibliografía	141
8. Anexos	169
Anexo 1. Imagen de un flebotomo	171
Anexo 2. Zonas de estudio y rango altitudinal	172
Anexo 3. Imágenes de distintos lugares de captura de flebotomos	173
Anexo 4. Imágenes de tipos de agujeros donde se han colocado las trampas	174
Anexo 5. Imágenes de la recogida de flebotomos de los papeles adhesivos	175
Anexo 6. Claves de identificación de los flebotomos	176
Anexo 7. Cuestionario dirigido a los veterinarios	178
Anexo 8. Ejemplo del uso de los Sistemas de Información Geográfica (SIG)	180

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA LEISHMANIOSIS

En la actualidad, el cambio global, la expansión de los asentamientos humanos y los movimientos migratorios de personas y animales alrededor del mundo conducen a un incremento en el riesgo de dispersión de enfermedades transmitidas por vectores. Este hecho es debido principalmente a alteraciones en la dinámica de transmisión de las enfermedades así como a la interacción entre vectores, parásitos y hospedadores, dando lugar a cambios en sus patrones de distribución tanto en áreas endémicas como en áreas previamente indemnes (Beugnet y Marié, 2009; Brooks y Hoberg, 2007; Colwell y col., 2011; Kovats y col., 2001; Maroli y col., 2012; Patz y col., 2000; Sutherst, 2004). Entre estas enfermedades se encuentra la leishmaniosis, actualmente considerada como una enfermedad emergente o re-emergente en algunas partes del mundo (Ashford, 2000; Desjeux, 2001; Gállego, 2004; Maroli y col., 2012; Ready, 2008, 2010; WHO, 2010).

1.1.1 LA LEISHMANIOSIS DESDE UN PUNTO DE VISTA GLOBAL

La leishmaniosis es endémica en regiones tropicales y subtropicales del Nuevo y Viejo Mundo y se encuentra distribuida en 98 países con más de 350 millones de personas en riesgo (Alvar y col., 2004; Desjeux, 2004; WHO, 2010). 72 de los países afectados se encuentran en vías de desarrollo, tratándose de una enfermedad estrechamente ligada a la pobreza, principalmente presente en áreas rurales y suburbanas (Alvar y col., 2006; den Boer y col., 2011; Maroli y col., 2012). Su prevalencia es de aproximadamente 12 millones de personas infectadas con una incidencia estimada de 2 millones de casos nuevos por año. La mortalidad presenta cifras nada despreciables, cuya tasa anual alcanza los 60.000 fallecimientos, siendo superada únicamente por la malaria en lo que a dolencias parasitarias se refiere (WHO, 2010). Todo ello teniendo en cuenta la bien documentada subestimación de casos debida a la ineficacia, o incluso inexistencia, de competentes sistemas de vigilancia epidemiológica, como ya indican algunos autores (Alvar y col., 2012; Antinori y col., 2012; Copeland y col., 1990; Desjeux, 2004; Maia-Elkhoury y col., 2007; Mosleh y col., 2008; Portús y col., 2007; Ready, 2008; Singh y col., 2006; Yadon y col., 2001; WHO, 2010).

Introducción

La leishmaniosis está causada por protozoos flagelados del género *Leishmania* y es transmitida por insectos dípteros nematóceros del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, que actúan como vectores de un modo altamente especializado y restringido (Desjeux, 1996; Gállego, 2004; Killick-Kendrick, 1990; Ready, 2008). La leishmaniosis se presenta bajo un amplio espectro de formas clínicas, afectando a una gran variedad de especies de mamíferos, entre ellas al hombre, por lo que suele hablarse de un conjunto de enfermedades, las leishmaniosis. Mayoritariamente afectan a animales, siguiendo un ciclo de tipo zoonótico, y los humanos resultan infectados de forma accidental cuando se encuentran en una área endémica (Sharma y Singh, 2008).

El género *Leishmania* se caracteriza por la presencia de un kinetoplasto, una mitocondria gigante que contiene ADN extranuclear. Presenta dos estadios evolutivos destacables, la forma amastigota, oval y de pequeño tamaño (2-6µm de diámetro), que contiene un núcleo, un kinetoplasto y un axonema intracitoplasmático o flagelo interno, y la forma promastigota, fusiforme, de mayor tamaño (7-15µm de longitud), con un núcleo central, un kinetoplasto prenuclear y un largo flagelo anterior libre (Ashford, 2000; Dedet y Pratlong, 2003; Gállego Berenguer, 2003).

El género *Leishmania* Ross, 1903 está incluido dentro de la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida, subreino Protozoa (Bañuls y col., 2007; WHO, 2010). A nivel global, unas 20 especies pertenecientes a este género han sido identificadas como patogénicas para los humanos (Ashford, 2000; Bañuls y col., 2007; Desjeux, 1996), las cuales se hayan incluidas en dos de los subgéneros que lo comprenden: *Leishmania*, en el Viejo Mundo, y *Viannia*, en el Nuevo Mundo (Bates, 2007; Gállego, 2004; Lainson y Shaw, 1987; WHO, 2010). Un elevado número de factores virulentos dependen del parásito, de modo que la especie de *Leishmania* aislada determina fuertemente como va a desarrollarse la enfermedad. Por tanto, su identificación es esencial en cada foco debido a sus implicaciones en el conocimiento epidemiológico, control y tratamiento de la enfermedad (WHO, 2010).

La clasificación de *Leishmania* se basó en su inicio en criterios eco-biológicos. Posteriormente, la variabilidad del parásito y su efecto en la epidemiología se han estudiado de forma tradicional mediante técnicas isoenzimáticas y caracterización de zimodemas permitiendo efectuar diversas clasificaciones para el género *Leishmania* (Gállego y col., 2001; Martín-Sánchez y col., 1996; Pratlong y col., 1991, 2009; Rioux y col., 1990; Thomaz-Soccol y col., 1993a,b). Durante los últimos años, y aun siendo ésta la técnica de referencia aplicada al más grande y variado número de aislados de *Leishmania* en el último cuarto de siglo, la

validez de esta clasificación ha sido repetidamente cuestionada (Schönian y col., 2008). Más recientemente, se ha estado realizando el genotipado de cepas de *Leishmania*, aisladas de distintos hospedadores, gracias a la aplicación de técnicas de biología molecular, lo que ha permitido observar una gran variabilidad entre aquellas pertenecientes a un mismo zimodema (Bañuls y col., 2007; Botilde y col., 2006; Montoya y col., 2007; Rotureau y col., 2006; Schönian y col., 2008, 2010, 2011).

Si bien la leishmaniosis presenta una distribución mundial, con excepción del continente Antártico (Gállego, 2004), algunas de las especies del género presentan una distribución geográfica más o menos focalizada como, por ejemplo, *L. donovani*, presente en China, Irán, Etiopía o Arabia Saudí, *L. tropica*, ampliamente difundida en el Norte de África con ciclos epidémicos bien conocidos en Sudan, Sudan del Sur, Etiopía y Kenia, así como en el subcontinente Indio (India, Bangladesh y Nepal) y en otros países de la cuenca mediterránea como Grecia, *L. brasiliensis*, presente en algunos países sudamericanos como en la Guayana Francesa, Venezuela o Brasil, y *L. infantum*, especie presente en España, Francia, Portugal, Italia, Malta, Grecia, Chipre, Albania, Yugoslavia o Rumania (Antinori y col., 2012; Ashford, 2000; Desjeux, 2001; Léger y Depaquit, 2008; Ready, 2008) y también en países de Sudamérica (Antinori y col., 2012; Barrio y col., 2012; Batista y col., 2012; de Almeida y col., 2012; de Lima y col., 2009).

Las distintas especies de *Leishmania* presentan distintas modalidades de ciclos epidemiológicos; sin embargo, todas ellas desarrollan un mecanismo de infección similar (Palatnik de Souza y Day, 2012). El ciclo indirecto o heteroxeno de las leishmanias tiene lugar en el interior de células macrofágicas del sistema fagocítico mononuclear de mamíferos y se completa con el concurso de los hospedadores invertebrados, hembras de flebotomos, en el tubo digestivo de los cuales el parásito se multiplica. Como ya se ha mencionado, el ciclo biológico comprende la intervención de dos formas evolutivas principales: la intracelular en el hospedador vertebrado, llamada amastigota, y la extracelular en el hospedador invertebrado, la forma promastigota (Ashford, 2000; Dedet y Pratlong, 2003; Gállego, 2004; Gállego Berenguer, 2003). Cuando el flebotomo parasitado pica a un hospedador vertebrado para alimentarse, le inocula formas promastigotas de su intestino a través de la probóscide (Killick-Kendrick, 1999). Estas formas son fagocitadas por los macrófagos donde se transforman en amastigotes y se dividen por fisión binaria hasta que la membrana del macrófago se rompe y éstas vuelven a ser fagocitadas de nuevo por otros macrófagos cercanos u otras células del sistema retículo-endotelial, pudiéndose diseminar hacia otros órganos a través de la

circulación, principalmente la médula espinal, el hígado y el bazo (Dedet y Pratlong, 2003; Gállego-Berenguer, 2003; Neuber, 2008). Los parásitos pueden ser de nuevo ingeridos mediante la picada de otro flebotomo, donde las formas amastigotas serán liberadas de sus células hospedadoras y transformadas, de nuevo, en formas promastigotas infestantes en la zona anterior del intestino. Estas complejas transformaciones morfológicas y funcionales comportan la diferenciación de promastigotes procíclicos a metacíclicos o infectivos que, al ser incapaces de fijarse a la pared del intestino, se dirigen a las regiones bucales donde bloquean la faringe de los flebotomos y son regurgitados en el transcurso de una ingesta sanguínea subsiguiente, penetrando por la lesión producida durante la picadura (Alcover y col., 2012; Bates, 2007; de Almeida y col., 2003; Sacks, 2001; Volf y col., 2008). Se ha descrito también la transmisión mediante parásitos presentes en la saliva del vector (Killick-Kendrick y Rioux, 2002). En función de su localización y diseminación a partir del punto de inoculación, darán lugar a una u otra forma clínica de la enfermedad. Otros factores que pueden incidir en la topografía de las leishmanias son el tamaño del inóculo, los componentes de la saliva del hospedador así como el estado inmunitario del mismo, entre otros (Killick-Kendrick, 1987).

1.1.1.1 LA LEISHMANIOSIS HUMANA

En el hombre, la leishmaniosis puede cursar con un amplio rango de signos y/o síntomas clínicos siendo las formas visceral y cutánea las más comunes (Antinori y col., 2012; Gállego, 2004; WHO, 2010). La leishmaniosis visceral es la forma más severa de la enfermedad, afectando a los órganos internos, y de fatal desarrollo si no se trata. La mayoría de infecciones son asintomáticas (Biglino y col., 2010; Michel y col., 2011; Riera y col., 2004, 2008), aunque la malnutrición y la inmunosupresión predisponen al desarrollo de la enfermedad clínica (WHO, 2010). El 90% de los casos ocurre en las áreas más pobres de Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudan y Sudan del Sur (Desjeux, 2004; WHO, 2010). Debido a la coinfección con el VIH y a la inmunosupresión en trasplantados y personas bajo tratamiento quimioterapéutico, la leishmaniosis visceral ya no queda restringida únicamente a áreas endémicas ni a niños, que era el grupo más afectado hasta hace poco tiempo, y el número de casos continúa en aumento (Alvar y col., 1997; 2008; Desjeux y Alvar, 2003; Ezra y col., 2010; Palumbo, 2010; WHO, 2010). En el sur de Europa, por ejemplo, más del 70% de los casos de leishmaniosis visceral en adultos están asociados al VIH (WHO, 2010). Por otra parte, la forma cutánea es la más común. La leishmaniosis cutánea, que puede revertir de

forma espontánea, es causante de úlceras en cara, brazos y piernas, dando lugar a serios problemas de discapacidad y lesiones desfigurantes múltiples. La clínica tiende a variar en función de los distintos tipos de parásito, del estado inmunológico e incluso de la respuesta inmune determinada genéticamente por los pacientes. El 90% de los casos ocurren en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Sudan del Norte, Irán, Perú y Siria (Desjeux., 2004; WHO, 2010). En Sudamérica existe una leishmaniosis de tipo tegumentario que afecta a las mucosas y que ocasiona las mencionadas lesiones desfigurantes, provocando así la discriminación y estigma social asociados a la enfermedad. Este tipo de leishmaniosis recibe el nombre de leishmaniosis mucocutánea (Desjeux, 2004; Gállego, 2004).

1.1.1.2 LOS RESERVORIOS DE LA LEISHMANIOSIS

El ciclo de las leishmanias es heteroxeno, alternándose entre un hospedador invertebrado (flebotomos) y otro vertebrado, un mamífero. Además del humano, otras especies de mamíferos se han visto afectadas por distintas especies de *Leishmania*, lo que da lugar a distintas modalidades de ciclos epidemiológicos, zoonótico o antroponótico y, dentro de los primeros, de tipo zoonótico primario, con intervención de un hospedador selvático, o secundario, con intervención de un animal doméstico (Killick-Kendrick, 1987). La presencia de uno u otro tipo de ciclo epidemiológico dependerá de la especie de *Leishmania*.

Normalmente, suele existir un reservorio hospedador principal en un foco particular, pero otros animales presentes en el área pueden resultar infectados, siendo hospedadores accidentales. Aún así, la mera presencia de infección en una especie en particular no indica necesariamente que sea un reservorio de la misma (WHO, 2010). Se han encontrado infecciones en animales tanto domésticos como salvajes, que pueden o no mostrar signos aparentes de infección, como por ejemplo, gatos, perros, caballos, canguros, ratas y otros roedores, zarigüeyas y perezosos, entre otros (Bousslimi y col., 2012; Carreira y col., 2012; Fernández-Bellón y col., 2006; Gramiccia, 2011; Grevot y col., 2005; Hamadto y col., 2007; Humberg y col., 2012; Koehler y col., 2002; Maia y col., 2010, 2011; Maroli y col., 2007; Martín Sánchez y col., 2007; Portús y col., 2002; Rose y col., 2004; Rotureau, 2006; Sobrino y col., 2008; Solano-Gallego y col., 2003; WHO, 2010).

En el caso concreto de *L. infantum*, ésta ha sido detectada, además de en algunos de los animales ya citados, en tejones, martas, mangostas, ginetas, mustelas, zorros, lince ibérico,

conejos, gallinas, y otros cánidos como lobos o chacales, pero su significado epidemiológico no está comprobado (Abranches y col., 1983; Azizi y col., 2011; Baneth y col., 1998; Chitmia y col., 2011; Criado-Fornelio y col., 2000; Fisa y col., 1999; Gramiccia y col., 1982; Martín-Iniesta y col., 1982; Millán y col., 2011; Morillas y col., 1985; Papadogiannakis y col., 2010; Portús y col., 2002; Quinnell y Courtenay, 2009; Rioux y col., 1968). Solo se ha demostrado que los zorros y las liebres podrían mantener el ciclo salvaje de la enfermedad, siendo los perros los responsables del ciclo doméstico (Alvar y col., 2004; Molina y col., 2012).

1.1.1.2.1 LA LEISHMANIOSIS CANINA

Alrededor del mundo, distintas especies de *Leishmania* han sido aisladas del perro como son *L. infantum*, principalmente en los países de la cuenca mediterránea y Oriente Medio, *L. tropica* y *L. donovani* en el Viejo Mundo, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. peruviana* en el Nuevo Mundo. A pesar de su aislamiento, se considera que el perro es reservorio y presenta importancia epidemiológica demostrada para *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. peruviana* (Gállego, 2004; Dantas-Torres, 2007). En el caso de *L. infantum*, a pesar de haberse hallado el parásito en varias especies de mamíferos, se considera al perro como principal reservorio de la enfermedad (Gramiccia y Gradoni, 2005; Solano-Gallego y col., 2001).

La leishmaniosis canina es una enfermedad ampliamente distribuida y presente en 42 países de Europa, África, Asia y América. Se considera la mayor infección zoonótica potencialmente fatal en estas regiones, sospechándose su presencia en otros tres países de África (Baneth y col., 2008; Gállego, 2004; Ready, 2008; WHO, 2010). Se ha estimado que por lo menos 2,5 millones de perros están infectados solamente en el suroeste de Europa (Moreno y Alvar, 2002) y que la enfermedad se está expandiendo hacia el norte, introduciéndose en las faldas de cadenas montañosas como los Alpes y los Pirineos (Baldelli y col., 2011; Biglino y col., 2010; Dereure y col., 2009; Ferroglia y col., 2005; Maroli y col., 2008). Como recogen Solano-Gallego y col., 2009 la prevalencia de la enfermedad varía en función de las condiciones ecológicas y climáticas de cada país, presentando valores alrededor del 90% en el sur de Francia (Berrahal y col., 1996) o del 65% en el centro de Grecia (Leontides y col., 2002).

A pesar de ser una enfermedad considerada importante bajo un punto de vista socio-económico y/o sanitario por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), y considerando

que los perros constituyen el mayor reservorio del parásito y representan un riesgo para los humanos (Dujardin y col., 2008; Gállego, 2004; Ready 2010), el control es prácticamente nulo existiendo una elevada subestimación de casos.

La leishmaniosis canina puede cursar con afectación visceral y cutánea aunque generalmente, y a diferencia de la leishmaniosis humana, se suelen presentar signos clínicos cutáneos y viscerales de forma concomitante (Dereure, 1999; Gállego, 2004; Solano-Gallego y col., 2001). El periodo de incubación de la enfermedad, antes de la aparición de la clínica, puede tardar de tres meses a siete años (Solano-Gallego y col., 2001). En focos endémicos, existe una baja tasa de enfermedad clínica aparente y, por tanto, muchos de los animales son asintomáticos, de modo que los casos clínicos son solamente la punta del iceberg en estas áreas (Alvar y col., 2004; Baneth y col., 2008; Miró y col., 2008; Solano-Gallego y col., 2009). Hay que remarcar que tanto los perros sintomáticos como los asintomáticos son infectivos para los flebotomos (Molina y col., 1994). Estudios longitudinales en áreas endémicas han demostrado que la historia natural de los perros infectados puede transcurrir por distintos caminos (Oliva y col., 2006; Quinnell y col., 2001). En algunos perros, los signos clínicos severos de la enfermedad aparecen rápidamente después de la infección. Se cree que éstos no son capaces de desarrollar una respuesta celular efectiva, a pesar de ello tienen una fuerte pero inefectiva respuesta humoral (Barbiéri, 2006; Pinelli y col., 1994). Un segundo grupo de perros permanece infectado durante un largo periodo de tiempo (incluso años), pero son capaces de evitar la aparición de lesiones clínicas (Killick-Kendrick y col., 1994; Pinelli y col., 1994). De todos modos, un cambio en el estado de salud de estos perros o, por ejemplo, la administración de drogas inmunosupresoras o bien una enfermedad inmunosupresora severa, puede llevar a la activación de la infección latente y al desarrollo de signos clínicos (Baneth y col., 2008).

Los distintos signos clínicos manifestados en perros sintomáticos pueden presentar grados de severidad muy variables mostrando así la complejidad de esta enfermedad y de su epidemiología (Baneth y col., 2008). La mayoría suelen presentar caquexia, atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia y descamación. Otros signos que pueden aparecer son afectaciones dérmicas como dermatitis o lesiones incurables, así como esplenomegalia, disfunción renal, enfermedad del hígado, lesiones óseas, oculares, palidez de mucosas, fiebre, onicogriposis, epistaxis, anemia y pérdida de peso (Agut y col., 2003; Alexandre-Pires y col., 2006; Ciaramella y col., 2005; Jüttner y col., 2001; Lima y col., 2004; Naranjo y col., 2005;

Nieto y col., 1992; Papagogiannakis y col., 2005; Peña y col., 2000; Solano-Gallego y col., 2004, 2009; Vamvakidis y col., 2000).

Distintos factores tanto inherentes al perro como a las condiciones ecológicas y ambientales, como el género, la edad, la raza del hospedador, el hábitat del perro, la altitud, la vegetación o el clima, entre muchos otros, son considerados como factores de riesgo por algunos autores, estando asociados a la aparición de la enfermedad a través de estudios epidemiológicos en múltiples ocasiones (Abranches y col., 1991; Acedo-Sánchez, 1998; Alonso y col., 2010; Biglino y col., 2010; Fisa y col., 1999; França-Silva y col., 2003; Gálvez y col., 2010b; Morales-Yuste y col., 2011; Pozio y col., 1981; Ranque y col., 1975; Sideris y col., 1996; Solano-Gallego y col., 2000; Zaffaroni y col., 1999).

La detección y el tratamiento de los casos de leishmaniosis canina que aparecen en zonas no endémicas, donde la infección natural no suele ocurrir, como en el norte de Europa, necesitan de actuaciones rápidas para evitar la aparición de nuevos focos de la enfermedad (Baneth y col., 2008; Shaw y col., 2003; Teske y col., 2002). La mayoría de estos casos ocurren por el desplazamiento de perros hacia zonas endémicas por periodos vacacionales de los propietarios, adopciones o bien por la importación de otras razas para su comercialización (Baneth y col., 2008; Mettler y col., 2005; Passantino, 2006; Shaw y col., 2003). De este modo, se han encontrado casos en Holanda (Teske y col., 2002), Alemania (Gothe y col., 1997; Naucke y col., 2008) e Inglaterra (Shaw y col., 2009). A pesar de que estos perros ayudan a mantener la presencia del parásito entre la población canina, el riesgo de transmisión autóctona en casos de ausencia de los vectores es relativamente baja (Baneth y col., 2008; Solano-Gallego y col., 2009). A pesar de ello, si se alcanzaran las condiciones óptimas para la transmisión, como una elevada densidad de vectores y de perros, la infección podría extenderse rápida y ampliamente a través de la población canina (Oliva y col., 2006; Quinnell y col., 1997, 2003). De este modo, que cambios producidos en las dinámicas de población de los flebotomos así como cambios referidos a la población canina, llevarían a la aparición de nuevos focos permanentes (Solano-Gallego y col., 2009).

Existe también algún caso ocasional en la literatura de transmisión vertical de la enfermedad (Boggiatto y col., 2011; Rosypal y col., 2005), transmisión venérea (Silva y col., 2009), transmisión directa por transfusión sanguínea (de Freitas y col., 2006) o bien de perro a perro (Duprey y col., 2006), aunque sin evidencia experimental demostrada. Sin embargo, en ausencia de vectores, estos casos inusuales podrían jugar un rol importante en la epidemiología de la enfermedad (Solano-Gallego y col., 2009).

1.1.1.3 LOS FLEBOTOMOS VECTORES DE LA LEISHMANIOSIS

Los flebotomos juegan un papel crucial en la transmisión de diferentes agentes patógenos causantes de enfermedades zoonóticas. Además de la leishmaniosis también son responsables de la transmisión de la bartonelosis o enfermedad de Carrión y de ciertas arbovirosis (Abonnenc, 1972; Alexander y Maroli, 2003; Dolmatova y Demina, 1971; Izri y col., 2006; Maroli y col., 2012).

Son insectos dípteros nematóceros que pertenecen a la familia Psychodidae enmarcados en la subfamilia Phlebotominae (Léger y Depaquit, 2002; Maroli y col., 2012). De pequeño tamaño, entre 1 y 4 mm de longitud, tienen un aspecto muy característico que permite diferenciarlos del resto de insectos de forma rápida, incluso a simple vista: el cuerpo es de color generalmente pálido (amarillento, grisáceo o marronáceo), aunque algunas especies son prácticamente negras, y está cubierto de finas sedas lo que les confiere un aspecto muy peludo. El tórax es giboso y en él se presentan tres pares de patas muy largas y finas, dos alas lanceoladas peludas, de venación característica, de casi igual longitud que el cuerpo y que en posición de reposo forman una “V” (Gil Collado, 1989; Killick-Kendrick, 1999) (ver Anexo 1).

Se considera que el origen de los flebotomos es anterior a los 120 millones de años. La primera especie de este grupo fue descrita en 1786 por Scopoli (Léger y Depaquit, 2002) y hasta la fecha se han descrito unas 800 especies, pero solamente entre un 10-15% de ellas actúan como vectores, de las cuales unas 30 son consideradas de importancia en salud pública (Bates, 2007; Maroli y col., 2012; Sharma y Sing, 2008). Algunas especies están adaptadas de forma específica a la transmisión de una especie concreta de *Leishmania*, mientras que otras son capaces de transmitir varias especies distintas (Alcover y col., 2012; de Almeida y col., 2003; Volf y col., 2008; WHO, 2010).

Los flebotomos constituyen un grupo homogéneo y monofilético, cuya posición taxonómica ha sido objeto de controversia (Léger y Depaquit, 2002; Maroli y col., 2012). La posición de las especies del Viejo Mundo está más aceptada que la de aquellas que pertenecen al Nuevo Mundo (Léger y Depaquit, 1999, 2002). La revisión más aceptada para éstas últimas es la de Galati 2003 (Maroli y col., 2012; WHO, 2010). En el pasado, las técnicas isoenzimáticas y de cromatografía de gases de los hidrocarburos cuticulares eran de gran ayuda para la identificación de especies morfológicamente indistinguibles (Benabdennbi y col., 1999; Dujardin y col., 1999; WHO, 2010). Actualmente, se están poniendo en práctica nuevas técnicas de biología molecular que permitan medir las diferencias genéticas y evolutivas entre

Introducción

poblaciones (Aransay y col., 2000; Barón, y col, 2008; Depaquit y col., 2000; di Muccio y col., 2000; Esseghir y col., 2000; WHO, 2010). Aun así, las características morfológicas siguen siendo las más ampliamente utilizadas para distinguir entre especies de flebotomos (WHO, 2010).

Los flebotomos se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones tropicales, subtropicales y templadas, incluyendo el sur de Europa, Asia, África, Australia y América. Su distribución se extiende hacia el norte hasta la latitud 50°N en el sudoeste de Canadá y justo por debajo de esta latitud en el norte de Francia y Mongolia. Su distribución por el sur llega hasta la latitud 40°S, pero se encuentran ausentes en Nueva Zelanda y las islas del Pacífico (Killick-Kendrick, 1999; Lane, 1993). Su distribución altitudinal va desde al nivel del mar hasta los 3.300 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.) en Afganistán (Killick-Kendrick, 1999; Maroli y col., 2012). En el Viejo Mundo, los géneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia* son los que presentan una distribución geográfica más amplia, encontrándose en nuestro entorno. El género *Phlebotomus* tiene una distribución netamente paleártica, mientras que las especies del género *Sergentomyia* están implantadas sobre todo en África subsahariana y en Asia meridional, aunque también se pueden encontrar en Oceanía (Léger y Depaquit, 2002). En el Viejo Mundo, el género *Sergentomyia* comprende especies herpetófilas que pueden picar ocasionalmente al hombre, por lo que no están incriminadas en la transmisión de enfermedades, (Izri y col., 2006; Killick-Kendrick, 1999; Lane, 1993; Léger y Depaquit, 2002).

La presencia de la leishmaniosis en un área geográfica determinada está influenciada por la presencia de los vectores, su comportamiento, periodo de actividad y fenología, tropismo trófico, edad fisiológica, tasa de parasitismo por leishmanias, biodiversidad de las poblaciones, etc., constituyendo el factor focalizador de la enfermedad (Alexander y Maroli, 2003; Rioux y col, 1970). Cada especie posee una biología compleja y propia. Se han estudiado otros potenciales vectores de las leishmaniosis, pero no hay evidencias significativas de su rol en la transmisión natural del parásito (Colombo y col., 2011; Coutinho y col., 2005; Coutinho y Linardi, 2007; Dantas-Torres y col., 2010; Paz y col., 2010).

En la región mediterránea europea, cinco especies del género *Phlebotomus* subgénero *Larroussi* son vectores demostrados de la enfermedad humana y canina causada por *Leishmania infantum*: *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. neglectus* y *P. tobbi*. En algunos focos, más de una especie puede ser responsable de la transmisión de la leishmaniosis (Guilvard y col., 1996; Rioux y col., 1986; WHO, 2010).

Su rango de actividad se encuentra entre los 15 y los 28°C, y siempre está asociado con una alta humedad relativa y ausencia de viento y lluvia. La mayoría de las especies antropofílicas presentan una actividad crepuscular o nocturna, cuando la temperatura desciende (19-20°C) y la humedad relativa aumenta, momento en que salen de sus lugares de reposo para ir a alimentarse, aunque algunas especies pican durante el día. El periodo de actividad varía según la localización geográfica, desde principios de primavera hasta finales de otoño en la cuenca mediterránea y todo el año en Sudamérica. Son muy sensibles al viento, no saliendo de sus lugares de reposo si las condiciones no son favorables (límite: 1m/seg.) (Killick-Kendrick, 1983, 1999; Léger y Depaquit, 1999, 2001; Sharma y Sing, 2008; WHO, 2010). Los flebotomos son malos voladores, por lo que no se dispersan a grandes distancias de los lugares de cría. No suelen desplazarse a más de 1 Km de distancia, aunque alguna especie se ha encontrado a unos 2 Km (Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 1999). El vuelo es silencioso y su desplazamiento lo efectúan a modo de pequeños saltos, de abajo hacia arriba, sobre paredes verticales y frecuentemente a baja altitud (Léger y Depaquit, 1999).

Los lugares de reposo diurno son microhábitats frescos, húmedos y oscuros e incluyen cuevas, fisuras en muros, rocas o suelo, vegetación densa, agujeros en árboles y contrafuertes, madrigueras de roedores y otros mamíferos, nidos de aves y termiteros (Killick-Kendrick, 1999; Miró y Molina, 2006). Por otra parte, el hombre le está ofreciendo una gran variedad de hábitats en ambientes humanizados o antropófilos, como casas, letrinas, bodegas, establos, sótanos, leñeras, jardines, mechinales, alcantarillas, basureros, granjas, etc. en los que se ha adaptado a vivir de manera óptima (WHO, 2010).

Los flebotomos son insectos holometábolos, con una fase de huevo, cuatro estadios larvarios terrestres, una pupa sésil y una fase adulta o imago. Los lugares de cría de los flebotomos son muy poco conocidos, dada la dificultad de su hallazgo debido al ciclo terrestre. En plena naturaleza, crían en aquellas zonas donde se acumula materia orgánica y se conserva una humedad relativa alta (Gil Collado, 1989; Léger y Depaquit, 2001; WHO, 2010).

Las formas juveniles requieren de humedad, temperatura fresca y materia orgánica para alimentarse. Los huevos suelen eclosionar entre los 7-20 días. El desarrollo larvario (tres mudas) es relativamente lento, durando unas tres semanas antes de la pupación. Los adultos emergen de la pupa después de entre diez y setenta días, con un predominio en la eclosión de machos al inicio. La duración de este ciclo varía mucho en función de la especie, la disponibilidad del alimento por parte de la larva y de la temperatura, que viene condicionada por la época del año y la ubicación geográfica del lugar de cría. En qué estado del ciclo vital

Introducción

ocurre el periodo de diapausa viene determinado por la especie y las condiciones ambientales (Gil Collado, 1989; Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 1999, 2001; Maroli y col., 2012; Molina, 1991; WHO, 2010).

Tanto los machos como las hembras se tienen que alimentar de líquidos. Ambos sexos ingieren sustancias azucaradas que les proporcionan la energía necesaria para su supervivencia (savia y néctar de plantas o azúcares que producen otros insectos como áfidos y cóccidos). Las hembras, además, necesitan ingerir sangre para que se pueda producir el desarrollo de los huevos (Killick-Kendrick, 1999), siendo así las únicas que pican y las responsables de la transmisión de la leishmaniosis, aunque pueden alimentarse de otros mamíferos, aves, reptiles o anfibios, en función de la especie (Gállego Culleré, 1997). La autogenia suele darse poco a menudo y en la primera oviposición. La digestión se efectúa entre 3 y 10 días y permite la maduración de 50 a 200 huevos que son puestos en el suelo (Izri y col., 2006). Típicamente dan saltos alrededor del hospedador antes de reposar para picar y cuando se acercan lo hacen en silencio (Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 2001). Los adultos presentan un aparato bucal de tipo picador-chupador, con piezas bucales cortas pero fuertes. Son insectos telmófagos, dado que al cortar la piel seccionan capilares y producen charcos de sangre alimentándose de ellos aspirándola directamente. También cortan terminaciones nerviosas originando la sensación de dolor o de “mordedura” que se tiene cuando pican. Entre aquellas especies domésticas, las hay exofílicas y endofílicas en función de si pican en el exterior o interior de las viviendas, aunque este comportamiento puede variar mucho dentro de una misma especie en distintas áreas geográficas (Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Sing, 2008).

Las distintas especies difieren en el número de ingestiones de sangre que realizan durante un ciclo gonotrófico. Se denomina ciclo gonotrófico al periodo de tiempo comprendido entre dos ingestiones de sangre. Frecuentes ingestiones de sangre aumentan el contacto entre vectores y vertebrados y, a su vez, la eficiencia de la transmisión de leishmaniosis. A lo largo de su vida, una hembra de flebotomo puede picar entre tres y cinco veces, aunque la gran mayoría muere después de realizar la primera puesta de huevos. Desde que ingieren sangre, y una vez ya fecundadas, las hembras se ocultan de 6 a 9 días durante los cuales, de forma simultánea, se digiere la sangre y terminan de desarrollarse los huevos, de tal manera que hasta que no han puesto los huevos no vuelven a picar de nuevo. El tiempo que transcurre desde una ingesta de sangre hasta la maduración de los huevos depende de la especie, la velocidad de digestión y la temperatura ambiente (Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 2001; WHO, 2010).

1.1.2 CONTROL DE LA LEISHMANIOSIS

En los últimos 10 años, se han dado grandes pasos en lo que respecta al tratamiento, diagnóstico y prevención de la leishmaniosis, y también el precio de muchos de los medicamentos clave ha disminuido considerablemente, lo que ha facilitado la implementación a nivel nacional y regional de programas de control de la enfermedad en algunos países (WHO, 2010). Aún así, el correcto funcionamiento de éstos es poco frecuente, de modo que la mortalidad y morbilidad de la leishmaniosis alrededor del mundo muestra una preocupante tendencia a incrementar (Maroli y col., 2012; WHO, 2010). Según los expertos, en la actualidad, sería factible un adecuado control de la enfermedad, ya que existen las herramientas necesarias; sin embargo, existe un abismo entre financiación, obligaciones políticas y cooperación nacional e internacional (WHO, 2010). Por otro lado, no existe un acuerdo científico sobre el manejo de la enfermedad, siendo necesario el debate y la estandarización de los estudios clínicos, así como los protocolos terapéuticos a seguir, el desarrollo y uso de vacunas o definir la mejor manera de realizar un buen diagnóstico en las clínicas veterinarias (Solano Gallego y col., 2009).

Las recomendaciones generales para el control de la enfermedad según la OMS son: 1) tratar los casos humanos, 2) eliminar los perros seropositivos y/u otros animales que actúan como reservorios, en aquellos focos de carácter zoonótico y 3) tratar las casas con insecticida (WHO, 2010). La selección del método o la combinación de métodos depende del tipo de leishmaniosis a ser controlada y del contexto específico donde nos encontramos (Kobets y col., 2012; Sharma y Sing, 2008).

Un rápido diagnóstico, aislamiento y tratamiento es crítico a la hora de prevenir la emergencia y/o reemergencia de la enfermedad. Es importante tener en cuenta que no hay un único test diagnóstico que sea capaz de dar una respuesta definitiva en todos los casos clínicos (Solano Gallego y col., 2009). La existencia de diferentes test diagnósticos es importante a la hora de detectar tanto a los perros sintomáticos como a los asintomáticos, por cuanto éstos pueden ser también fuente de infección para los flebotomos vectores (Molina y col., 1994), siendo los más útiles la demostración de la existencia de ADN del parásito en sangre u otros tejidos y la detección en suero de anticuerpos específicos. Es importante destacar que la información proporcionada por la presencia de ADN del parásito no debe separarse de los datos clínico-patológicos ni de las evaluaciones serológicas (Solano Gallego y col., 2009). La utilización de una u otra técnica para el diagnóstico de la leishmaniosis ha influido no sólo en la posibilidad de detectar animales asintomáticos al utilizar técnicas muy sensibles, sino también en la

Introducción

existencia de diferencias notables en la prevalencia de la enfermedad (Aisa y col., 1998; Iniesta y col., 2002; Riera y col., 1999).

Existe aún mucho trabajo por hacer en lo que se refiere al tratamiento de las leishmaniosis, a pesar de las muchas investigaciones que se están llevando a cabo (Santos y col., 2008). Las drogas utilizadas hasta ahora tienen una elevada toxicidad, muchos efectos adversos y un alto coste, además de no ser suficientemente efectivas (Antinori y col., 2012; Kobets y col., 2012; Maroli y col., 2012). Las más utilizadas siguen siendo el antimonio de meglumina, el alopurinol, la miltefosina o bien la anfotericina B liposomal (González y col., 2010; Miró y col., 2007, 2008; Mohebbi y col., 2007; Sundar y Benjamin, 2003; Sundar y Chakravarty, 2010a,b), para algunas de las cuales ya se han mostrado resistencias en humanos (Croft y col., 2006) o bien disminución de la sensibilidad en perros (Carrió y Portús, 2002). La combinación de las dos primeras se considera la más efectiva para el tratamiento de la leishmaniosis canina, constituyendo la medicación de primera elección (Solano-Gallego y col., 2009), aunque se están llevando a cabo muchos estudios con otras posibles combinaciones (Miró y col., 2009; Noli y Auxilia, 2005). Se ha demostrado que muchos de los animales tratados curan clínicamente pero siguen siendo portadores del parásito (Koutinas y col., 2001; Manna y col., 2009; Riera y col., 1999). Los perros constituyen un importante reservorio para la emergencia de cepas resistentes ya que su tratamiento es difícil. Por lo tanto, aun existiendo medicación registrada para humanos y perros, los dos hospedadores no deberían ser tratados con los mismos fármacos, un principio que no es siempre seguido (Schönian y col., 2008; WHO, 2010).

Algunas medidas preventivas sugeridas por algunos autores como el control a nivel del vector y del reservorio deberían ser útiles para controlar la expansión de la leishmaniosis en ciertas condiciones, pero no son aplicables en todos los contextos epidemiológicos y requieren infraestructuras y vigilancia por debajo de la capacidad de muchos países endémicos (Costa y col., 2007; Gavgani y col., 2002; Nunes y col., 2010; Sharma y Sing, 2008). Una correcta recogida de casos, el monitoreo de su distribución y el uso de encuestas veterinarias podrían ayudar a controlar la enfermedad (Ready, 2008). En algunos focos zoonóticos, los métodos utilizados incluyen la eliminación de los perros y la eliminación de los flebotomos, aunque no hay acuerdo a la hora de valorar su efectividad (Amóra y col., 2009; Claborn, 2010; Courtenay y col., 2002; Dietze y col., 1997; Moreira y col., 2004; Nunes y col., 2008; Palatnik de Souza y col., 2001; Romero y Boelaert, 2010; Sharma y Sing, 2008; Warburg y Faiman, 2011). El control del movimiento de perros de áreas endémicas a no endémicas

también es un factor a tener en cuenta (Moreira y col., 2004; Paranhos-Silva y col., 1998; Ready, 2010). A la vez es importante evitar la picada de los flebotomos, manteniendo a los perros resguardados durante las horas críticas o bien mediante repelentes tópicos así como redes mosquiteras impregnadas, usando insecticidas en el interior de casas, etc. Los piretroides son los insecticidas más ampliamente utilizados por su efectividad y su poca toxicidad. Se utilizan para proteger al reservorio canino en forma de collares impregnados, o bien de aplicación tópica, conocida como spot-on, o en spray (Alexander y Maroli, 2003; Gavvani y col., 2002; Killick-Kendrick y col., 1997; Maroli y col., 2001, 2010; Miró y col., 2008; Molina y col., 2001; Reithinger y col., 2004).

No hay enfoques simples, económicos o éticos para ser recomendados en el control de la leishmaniosis canina. En cualquier caso, la vigilancia y el control de la enfermedad en los perros domésticos son la clave para reducir la incidencia de la enfermedad humana en los focos zoonóticos (Day, 2011; Palatnik de Souza y Day, 2011; Petersen, 2009). El desarrollo de mejores vacunas, junto con la utilización de medicamentos e insecticidas tópicos, es un punto básico para un mejor control de la misma (Day, 2011; Palatnik de Sousa y col., 2009; WHO, 2010). Por tanto, el desarrollo de una vacuna efectiva, segura y asequible es una prioridad a nivel de salud pública global (Kedzierski, 2011). Existen vacunas comercializadas aunque de escaso éxito (Miró y col., 2008). Solo apuntar que actualmente se está comercializando una vacuna (CaniLeish®, Laboratorios Virbac) en los siguientes países: Alemania, Austria, Bélgica, España, Francia, Grecia, Holanda, Italia, Inglaterra, Portugal y Suiza, pero se desconoce aún su eficacia y la respuesta en la población canina en estudios independientes de campo.

1.1.3 EMERGENCIA Y/O REEMERGENCIA DE LA LEISHMANIOSIS EN EUROPA

En Europa, la leishmaniosis está producida principalmente por *Leishmania infantum*, con un ciclo de tipo zoonótico en la que el perro juega un papel primordial, y que se presenta en los humanos bajo dos formas clínicas, la leishmaniosis visceral y la leishmaniosis cutánea. Además, en algunas regiones de Grecia, y de forma esporádica, se da otro tipo de leishmaniosis cutánea causada por *L. tropica* y que afecta exclusivamente al hombre y también se ha identificado a *L. donovani* como causante de leishmaniosis visceral antroponótica (Ready, 2010; WHO, 2010).

Los focos de leishmaniosis por *L. infantum* se distribuyen en gran parte de la cuenca mediterránea, desde Portugal hasta Grecia, en Europa, y el Magreb, tratándose de la única enfermedad transmitida por vectores que ha sido endémica en Europa durante décadas (Desjeux, 2001; Dujardin y col., 2008). Tanto la leishmaniosis canina como la leishmaniosis visceral humana se han presentado de forma endémica en las regiones europeas caracterizadas por veranos secos y calurosos e inviernos con temperaturas templadas (Ferroglia y col., 2005).

En los últimos años, diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo han mostrado que se ha producido un incremento de la prevalencia en algunas áreas endémicas (Gálvez y col., 2010b; Martín-Sánchez y col., 2009). Por otro lado, también se ha puesto de manifiesto la expansión latitudinal de la enfermedad hacia el norte (Amusatogui y col., 2004; Capelli y col., 2004; Dujardin y col., 2008; Maroli y col., 2008; Miró y col., 2012; Morosetti y col., 2009), Esto ha permitido localizar nuevos focos de leishmaniosis en áreas consideradas tradicionalmente libres de algunos países endémicos (Baldelli y col., 2011; Biglino y col., 2010; Dereure y col., 2009; Ferroglia y col., 2005; Mencke, 2012; Ready, 2010; Táncoz y col., 2012). Además, se han detectados algunos casos autóctonos de leishmaniosis humana en países de Europa Central (Bogdan y col., 2001; Naucke y col., 2008).

Uno de los factores clave en la introducción de focos de leishmaniosis en zonas hasta la fecha indemnes es el calentamiento global, que habría permitido la presencia de especies de flebotomos vectoras en zonas más frías (Aspöck y col., 2008; Desjeux, 2001; González y col., 2010; WHO, 2010). Otro factor a tener en cuenta es la introducción, en estos países, de animales infectados (fundamentalmente perros, pero también gatos, caballos y otros animales domésticos) que han viajado a zonas endémicas o que han sido comprados en éstas, y que permitirían la infestación de los vectores (Colwell y col., 2011; Desjeux, 2001; Ferroglia y col., 2005; Jacob, 2008; Morosetti y col., 2009; Naucke y Schmitt, 2004; Naucke y col., 2008; Ready, 2008; Schroder y Schmidt, 2008).

1.1.3.1 LA LEISHMANIOSIS EN ESPAÑA

En España, la leishmaniosis está considerada como una enfermedad hipoendémica (0,41 casos cada 100.000 habitantes) (Alvar y col., 2012; Valcárcel y col., 2008).

Los primeros casos de leishmaniosis humana y canina fueron publicados en 1912 y 1913, respectivamente (Pittaluga, 1912, 1913), produciéndose un descenso de la incidencia de la

enfermedad en humanos durante el periodo de 1950-70 atribuido al uso de insecticidas durante la campaña antipalúdica en toda la cuenca mediterránea, además de en agricultura, y seguido por un segundo foco de emergencia en los años siguientes principalmente en adultos inmunosuprimidos coinfectados con el VIH (Alvar y col., 2012; Ashford, 2000; Botet y Portús, 1993; Gil Collado, 1977; Portús y col., 2007).

En la actualidad, la incidencia de la leishmaniosis visceral en pacientes VIH positivos ha disminuido entre un 50 y un 65% a partir de la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART) (Alvar y col., 2008; Cruz y col., 2006; López-Vélez y col., 2001). Aun así, es importante recalcar que en los últimos años la enfermedad ha retomado un notable interés, no solo como consecuencia del incremento y/o expansión de la leishmaniosis canina (Gálvez y col., 2010b; Martín-Sánchez y col., 2009; Miró y col., 2012), sino también por la introducción de nuevos grupos de riesgo para la leishmaniosis humana, como viajeros, inmigrantes o personas inmunodeficientes, y, a su vez, gracias a una mayor financiación por parte de los organismos públicos para el estudio de esta enfermedad (Ashford, 2000; Botet y Portús, 1993; Pavli y Maltezos, 2010),

Los estudios epidemiológicos sobre la endemidad de los focos de leishmaniosis humana y canina en España han sido llevados a cabo, principalmente, mediante estudios serológicos (Fisa y col. 1999; Gálvez y col., 2010b; Iniesta y col. 2002; Martínez-Cruz y col., 1990; Morales-Yuste y col., 2011; Riera y col. 2004; Solano-Gallego y col., 2005).

1.1.3.1.1 LA LEISHMANIOSIS HUMANA EN ESPAÑA

Los primeros datos oficiales sobre la leishmaniosis humana en España datan de 1982, momento en que pasó a ser una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO). A partir de 1996, su vigilancia pasó a ser competencia de cada comunidad autónoma, siendo considerada como una enfermedad de notificación obligatoria en 12 de las 17 comunidades autónomas. Sin embargo, los datos oficiales no recogen todos los casos reales existentes, de modo que hay una importante subestimación (Alvar y col., 2012; Dujardin y col., 2008; Portús y col., 2007; Valcárcel y col., 2008).

Actualmente, en España, la vigilancia epidemiológica de la leishmaniosis humana se realiza a través de la llamada Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) de las Comunidades Autónomas, dentro del apartado *Enfermedades endémicas de ámbito regional*. La coordinación de la red, recogida de datos, análisis y diseminación se realiza y mantiene a

nivel central, teniendo la potestad de realizar actuaciones suprarregionales en caso que fuera necesario. El sistema básico de recogida de datos se lleva a cabo a través de la cumplimentación y recogida de los casos de EDO por parte de todo el colectivo médico del país. Este sistema permite observar la tendencia que sigue la enfermedad a pesar de la significativa infranotificación existente: el año pasado se publicó que la subdeclaración en España era de un 40% (Valcárcel y col., 2008).

En la actualidad, sigue muriendo gente por leishmaniosis visceral en todos los grupos de edad, no llegando a diez muertes por año, siendo la notificación de la LV más elevada que para la LC, debido probablemente a que muchos casos de LC remiten por si solos pasando desapercibidos para el Sistema de Salud o bien, no se notifican de forma eficiente al no requerir ingreso hospitalario. En un estudio publicado en 2008 por Valcárcel y col., realizado con los datos referentes a ingresos hospitalarios en el ámbito público, se observó que las tasas más altas de incidencia las presentaban la Comunidad de Madrid y Castilla-La Mancha, y las más bajas se dieron en Galicia y Extremadura. En el norte de la península prácticamente no hay casos declarados (Valcárcel y col., 2008).

Es importante destacar el brote de leishmaniosis de mayor envergadura acaecido en nuestro país, producido recientemente en la Comunidad de Madrid. Desde el 1 de julio de 2009 hasta el 1 de febrero de 2012 se registraron 209 casos, 93 de ellos de leishmaniosis visceral y 116 de leishmaniosis cutánea (Alvar y col., 2012; Molina y col., 2012). El 83,7% de los casos eran de pacientes residentes en el municipio de Fuenlabrada. Clínicamente destaca el hecho de que se hayan encontrado en un buen número formas clínicas atípicas que debutan con una adenopatía sin lesión cutánea clara, fiebre ni alteraciones analíticas clásicas. En este caso concreto, parece ser que las liebres, muy abundantes en los parques públicos urbanos de la zona y que actúan como reservorio secundario de la enfermedad, han permitido un aumento en la tasa de transmisión de la misma y, como consecuencia, un incremento de la incidencia en la población humana debido a su masificación (Molina y col., 2012), siendo éste un ejemplo de cómo la acción humana puede actuar sobre la dinámica de transmisión de una enfermedad.

1.1.3.1.2 LOS RESERVORIOS DE LA LEISHMANIOSIS EN ESPAÑA

El ciclo epidemiológico de *L. infantum* en España sigue el patrón clásico, con el perro como principal reservorio. Además, a lo largo de los años se ha atribuido, de forma esporádica, el

papel de reservorio de la leishmaniosis a otras especies animales tales como la salamanquesa, gallina, gato, cordero y hurón (Botet y Portús, 1993). Además, en los últimos años, se han encontrado infectados gatos (Martín Sánchez y col., 2007), caballos (Fernández-Bellón y col., 2006; Solano-Gallego y col., 2003), conejos (Chitmia y col., 2011) y, recientemente, en liebres (Molina y col., 2012).

La existencia de una elevada proporción de infección por *L. infantum* en carnívoros salvajes (lobos, mangostas, ginetas, linceos, zorros, etc) y otros animales (cabras, ovejas, roedores, etc) (Criado-Fornelio y col., 2000; Portús y col., 2002; Sobrino y col., 2008) sugiere la existencia de un ciclo selvático independiente del perro, como se ha demostrado en el reciente brote de leishmaniosis humana de Fuenlabrada con las liebres actuando como reservorios (Molina y col., 2012) y evidenciando el comportamiento trófico oportunista de los flebotomos (de Colmenares y col., 1995).

1.1.3.1.2.1 LA LEISHMANIOSIS CANINA EN ESPAÑA

En España, a pesar de que se considera la leishmaniosis canina como una enfermedad de declaración obligatoria, siguiendo las indicaciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), existe una falta de datos oficiales que hace difícil obtener una figura real respecto a su distribución y prevalencia. Una característica de la enfermedad es la heterogeneidad de los focos, con seroprevalencias que van desde 0 hasta 34,6% (Alvar, 2001; Dujardin y col., 2008; Miró y col., 2012; Morillas y col., 1996). Si nos referimos a las prevalencias registradas, éstas se mueven en valores del 0 al 100% (Morales-Yuste y col., 2011).

1.1.3.1.3 LOS FLEBOTOMOS VECTORES EN ESPAÑA

Arias Encobet (1911) fue el primero en capturar flebotomos en España. Más tarde, Pittaluga y De Buen (1917) relacionaron a estos dípteros con la leishmaniosis en España. Desde entonces, se han llevado a cabo muchos estudios sobre la distribución de las diferentes especies de flebotomos en nuestro país, donde se han identificado hasta 11 especies distintas (Barón y col., 2011; Conesa Gallego y col., 1999; Depaquit y Léger, 1998; Gállego Berenguer y col., 1992; Gil Collado y col., 1989; Lucientes y col., 2001; Pesson y col., 2004). De todas las especies presentes en España, únicamente las hembras del subgénero *Larrossius* son capaces de transmitir *L. infantum*. De las especies potencialmente vectoras de la leishmaniosis zoonoantrópica por *L. infantum* en España se ha podido corroborar la capacidad vectorial de

dos de ellas, *P. ariasi* y *P. perniciosus* (Guilvard y col., 1996; Lucientes y col., 1988; Morillas y col., 1996; Rioux y col., 1986).

Si bien se considera la transmisión vectorial como responsable de la diseminación del parásito, no puede descartarse la infección a través de jeringuillas infectadas compartidas, fundamentalmente, entre la población drogodependiente (Cruz y col., 2002; Pineda y col., 2002).

1.2 LOS SISTEMA DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA (SIG)

Un SIG es un sistema para la gestión, análisis y visualización de información geográfica o espacial. La base de un SIG es, por tanto, una serie de capas de información espacial en formato digital que representan diversas variables (formato ráster) o bien capas que representan objetos (formato vectorial) a los que corresponden varias entradas en una base de datos enlazada. Esta estructura permite combinar en un mismo sistema información con orígenes y formatos muy diversos, incrementando la complejidad del sistema e integrando bases de datos espaciales y permitiendo a su vez la implementación de diversas técnicas de análisis de datos. Los datos están georreferenciados mediante sistemas de posicionamiento permitiendo trabajar sobre un modelo ajustado a la realidad. De este modo, los SIG se pueden utilizar para resolver distintas cuestiones como son: organización de datos, visualización de datos, producción de mapas, consultas especiales, análisis espacial, previsión y creación de modelos (Alonso y col., 2010; Barón y col., 2011; Chamaillé y col., 2010; Franco y col., 2011; Gálvez y col., 2010a, 2010b., 2011a; González y col., 2010; Hatermink y col., 2011; Rossi y col., 2007; Werneck y Maguire, 2002).

En la actualidad, los SIG se han convertido en herramientas que están tomando una gran importancia a la hora de entender la epidemiología de muchas enfermedades, entre ellas, la leishmaniosis, cuya epidemiología está cambiando no solo alrededor de la cuenca Mediterránea sino también en otras áreas endémicas en el Viejo y Nuevo Mundo. Estos sistemas, pueden facilitar la toma decisiones en el momento de planear estrategias de control de la enfermedad.

1.2.1 UTILIDAD DE LOS SIG EN EL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LEISHMANIOSIS

La epidemiología de la leishmaniosis depende de las características del parásito, las características ecológicas locales de los lugares de transmisión, la previa y la actual exposición de la población humana al parásito y el ampliamente variado comportamiento humano. De este modo, la distribución de la enfermedad puede verse enormemente afectada por los cambios ambientales como resultado de las modificaciones climáticas asociadas con el calentamiento global y, a su vez, por factores relacionados con la actividad del hombre, como la deforestación, la urbanización, la agricultura, etc. Cambios en la temperatura, la precipitación y la humedad pueden tener fuertes efectos en la ecología de los vectores y los reservorios mediante la alteración de su distribución e influenciando en la supervivencia del tamaño de población y en el desarrollo del ciclo. Por ejemplo, las leishmaniosis pueden desplazarse hacia zonas actualmente más cálidas donde un incremento de la temperatura media podría permitir la extensión de los periodos de alimentación de los flebotomos, o bien hacia áreas donde las bajas temperaturas podrían impedir el desarrollo larvario (Maroli y col., 2012; Schönian y col., 2008; WHO, 2010).

En el área mediterránea existe una necesidad urgente de implementar un sistema de vigilancia epidemiológica más eficaz, intercambiar información de manera multidisciplinar y analizar de forma consensuada la tendencia de la enfermedad (Schönian y col., 2008). En la actualidad, para estudiar cómo pueden afectar estos distintos factores a la distribución de la enfermedad y elaborar mapas de riesgo de la misma, se utilizan como herramientas los SIG. Hatermink y col. (2011) desarrollan en su artículo un método para predecir el riesgo de establecimiento de la leishmaniosis canina en nuevas localizaciones geográficas bajo ciertas condiciones climáticas y ambientales. Mediante el uso de un SIG combinan toda la información recogida, desde la distribución de especies presentes y la densidad población canina así como distintas imágenes obtenidas vía satélite relacionadas con la cobertura del suelo, la fragmentación del hábitat y otros como las condiciones climáticas, siendo el primer análisis que combina un modelo de predicción de abundancia del vector con un modelo mecánico basado en la temperatura, proveyendo un nuevo conjunto de herramientas para el estudio del riesgo de brotes de enfermedades transmitidas por vectores. Por su parte, Franco y col. (2011) investigan las posibilidades de producir un mapa de riesgo sobre la predicción de la leishmaniosis canina en el oeste de Europa. Éste está basado en las bases de datos históricos de la misma, recogidas por los distintos autores desde 1965 hasta 2006, a través de la

construcción de modelos multivariados de regresión logística utilizando un SIG para encontrar los principales predictores de la prevalencia de la enfermedad en la zona. Se basan en una serie de variables, incluyendo índices climatológicos y de vegetación obtenidos vía satélite. Chamailé y col. (2010), también construye mapas de riesgo de la leishmaniosis canina mediante una base de datos retrospectiva que incluye diversas características, como el tipo de muestreo realizado, el método diagnóstico, información sobre las características de los perros o localización mediante coordenadas geográficas. Gracias al mapeo a través de un SIG se pueden observar los patrones de distribución y facilitar los análisis estadísticos. A su vez, otras variables como la altitud, el tipo de vegetación, la precipitación, así como distintas medidas de temperatura o bien densidades de población humana y canina, fueron transformadas para ser integradas en el SIG y así poder ser evaluadas a la hora de realizar el mapa de riesgo para la leishmaniosis canina basado en una aproximación a los nichos ecológicos. En España, Gálvez y col. (2011a) construyen mapas de distribución del vector para la Comunidad Autónoma de Madrid basándose en variables ambientales para después proyectarlos en futuros escenarios climáticos y así poder predecir la distribución de los vectores, con ayuda de las herramientas que forman parte de los SIG.

Los SIG y la tecnología vía satélite son herramientas muy útiles para el análisis espacial y temporal de las características del paisaje que pueden ayudar a identificar poblaciones diana, así como predecir el comportamiento de la enfermedad y sus vectores, permitiendo que sean implementadas eficaces medidas de control (Gálvez y col., 2011a).

1. 3 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La leishmaniosis por *L. infantum* predomina a lo largo de la costa mediterránea, estando presente la enfermedad en España, Francia, Italia y Portugal, entre otros países (Desjeux, 2001; Campino y col., 2006; Gállego, 2004; Maroli y col., 2012). Sin embargo, presenta una distribución heterogénea y son muchas las lagunas existentes sobre su distribución geográfica, careciendo de datos sobre su presencia en muchas zonas de la geografía ibérica. Tal es el caso de la provincia de Lleida y Andorra, áreas limitadas por zonas donde la endemia es alta y conocida desde hace años tales como la región de los Pirineos Orientales en Francia y la comarca del Priorat en España.

En Cataluña, se dispone de datos muy parciales de la leishmaniosis humana a través del *Butlletí Epidemiològic de Catalunya* (879 casos declarados desde 1982 hasta 2010), siendo la

incidencia real muy superior debido a la existencia de una importante subdeclaración de casos (Portús y col., 2007). Durante el periodo citado, 37 de los casos humanos fueron declarados en la provincia de Lleida. En su mayoría procedían de Lleida capital, sin que se pudiera disponer de datos precisos de la localidad de residencia del enfermo. Por otro lado, los movimientos humanos, sobre todo durante el periodo estival en que tiene lugar la transmisión, hace difícil poder establecer el lugar de origen de la infección.

El flebotomo es el elemento focalizador de la leishmaniosis. Sin embargo, no existe un estudio completo de la distribución de las especies vectoras de leishmaniosis en España. Además, muchas veces los datos obtenidos de los distintos estudios no permiten su comparación dado que la metodología utilizada, en uno u otro estudio, ha variado considerablemente con respecto al tipo de trampas, las épocas en que se han llevado a cabo las capturas, la periodicidad y el número de días de las capturas, entre otros. Es por ello que, en el marco del proyecto europeo EDEN (Emerging Diseases in a changing European eNvironment), se decidió efectuar un estudio de la distribución de los flebotomos vectores de una forma estandarizada, con objeto de poder disponer de datos comparativos de las distintas áreas geográficas muestreadas por los distintos equipos del proyecto.

Por otro lado, se pretendía disponer de datos previos de la presencia y etología de los flebotomos que pudieran ser utilizados como base para futuros estudios sobre la influencia de los cambios globales, incluyendo los climáticos, en la distribución, emergencia y/o reemergencia de la leishmaniosis, dado que estos cambios influyen directamente en la distribución de los flebotomos y, en consecuencia, en la distribución de la leishmaniosis tanto humana como canina.

El estudio entomológico en la Península Ibérica se ha centrado principalmente en la provincia de Lleida de la que se dispone de un único artículo, muy focalizado, acerca de la presencia de los flebotomos (Gállego y col., 1990). La extensión del estudio a toda la provincia, de gran diversidad ecológica, nos permitiría incidir en los factores que influyen en la distribución de los flebotomos vectores.

El área de estudio se ha extendido a Andorra, país estratégicamente situado entre las zonas de estudio del proyecto EDEN de España y Francia y del que se dispone del resultado de una única estación de muestreo (Lucientes y col., 2001).

La casuística humana proporciona datos poco precisos sobre la distribución real de la enfermedad, hecho no tan patente en lo que se refiere a la leishmaniosis canina dado el

Introducción

menor movimiento traslacional de perros, sobre todo en zona rural (Portús y col., 2007). Por otro lado, el perro es el reservorio principal en el ciclo epidemiológico de *L. infantum*. A pesar de ello, no existían datos de la leishmaniosis canina en la provincia de Lleida. Es por ello que se decidió enviar un cuestionario a todos los veterinarios con clínica de pequeños animales de la provincia.

La prevalencia de la leishmaniosis canina en España ha sido siempre difícil de esclarecer, entre otros motivos, porque los animales más expuestos, los perros de áreas suburbanas y rurales, raramente son diagnosticados, ya que no suelen acudir a los centros veterinarios. En el noroeste de los Pirineos Catalanes (provincia de Lleida) los datos son inexistentes mientras que en otras partes de Cataluña la seroprevalencia en poblaciones de perros al azar puede llegar a alcanzar el 10% (Portús y col., 2007). Además, y dado que la comarca del Pallars Sobirà se encuentra fronteriza a posibles nuevos focos de leishmaniosis en Francia, objeto de estudio por parte del equipo francés de EDEN (Hartemink y col., 2011), se decidió profundizar en el estudio de la leishmaniosis canina en esta zona.

En resumen, el estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la provincia de Lleida presenta las siguientes ventajas: 1) Lleida se encuentra en una situación geográfica intermedia entre los focos bien conocidos del sur de Cataluña y otras áreas de España (Fisa y col., 1999; Gálvez y col., 2010b; Martín-Sánchez y col., 2009) así como del sur de Francia (Chamaillé y col., 2010; Pratlong y col., 2004); 2) Se trata de una zona donde no se han realizado estudios previos de forma exhaustiva y los pocos datos entomológicos de que se dispone han permitido detectar la presencia de los vectores de la leishmaniosis; y 3) Existen casos humanos declarados en la zona, lo que nos hace sospechar sobre la existencia de un foco de leishmaniosis endémica todavía sin identificar. Dicho foco podría ser reciente, y consecuencia de la expansión de la enfermedad hacia los Pirineos, o bien podría tratarse de un foco ya existente pero desconocido por la falta de estudios previos en la zona.

En cualquier caso, la obtención de datos epidemiológicos sobre la enfermedad, acompañado de datos medioambientales, podrá servir de base para la monitorización de la evolución de la endemia en estudios posteriores.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJECTIVES AND WORK PLAN

2.1 OBJECTIVES

The general aim of the present work is to obtain epidemiological data on leishmaniasis that could be used as a base to monitor the evolution of the disease in later studies.

The specific objectives of the study are:

- To obtain data on the distribution of canine leishmaniasis in Lleida province and the factors that influence it.
- To obtain data on the distribution and density of the leishmaniasis vectors (sand flies) in Lleida province.
- To gain further insight into the geographical distribution of sand flies in the Pyrenean region through the study of sand flies in Andorra.
- To improve our understanding of the environmental factors influencing the distribution of leishmaniasis sand fly vectors and determines the altitudinal distribution of the *Leishmania infantum* vector species (*Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus*).

2.2 WORK PLAN

The present work has been carried out within the framework of the EDEN European project (Project number 400764/GOCE-CT-2003-010, 6th Framework Programme, EU) on the control of emerging diseases, specifically in the subproject on leishmaniasis. The work plan and methodology have been standardized by the members of this project (see *Material y métodos*).

The work plan carried out to fulfil the objectives includes:

- A) Study of the vector
 - Campaigns of sand fly capture in their period of activity in Lleida province and Andorra (summer of 2006 and 2007). Analysis of the results.
 - Collection, record and analysis of biotic and abiotic data of the sand fly capture stations.
- B) Study of the reservoir

Objetivos y plan de trabajo

- Analysis of a retrospective survey on canine leishmaniasis carried out among small animal veterinarians practicing throughout Lleida province.
- Analysis of a cross-sectional study on canine leishmaniasis seroprevalence in the county of Pallars Sobirà (Lleida province) using different serological tests.
- Analysis of a questionnaire on leishmaniasis perception among owners of the studied dogs.
- Collection, record and analysis of the data on the location and characteristics of the studied canine population.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se engloba dentro del proyecto europeo Emerging Diseases in a changing European eNvironment (EDEN), concretamente dentro del sub-proyecto de leishmaniosis (http://www.eden-fp6project.net/emerging_diseases/leishmaniosis). Se presenta a continuación un resumen general del apartado “Material y métodos”, que se puede consultar, de forma más detallada, en las publicaciones que conforman la presente Tesis Doctoral.

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio abarca la provincia de Lleida así como el principado de Andorra, cuyas características principales se describen a continuación (ver Anexo 2).

La provincia de **Lleida** está situada en el NE de España, en la comunidad autónoma de Catalunya, estando delimitada el área de estudio por las siguientes coordenadas: 42°51'N y 0°42'E; 41°16'N y 0°25'E; 42°18'N y 1°50'E; 41°40'N y 0°19'E. Lleida limita con Andorra y Francia (concretamente con los departamentos de Ariège y Haute Garonne, región Midi-Pyrénées) en el norte, las provincias españolas de Girona y Barcelona en el este, con Tarragona en el sur y con Zaragoza y Huesca en el oeste. La provincia ocupa 12.173 km² de extensión y tiene una población de 442.370 habitantes (36,3 habitantes/km², aproximadamente), siendo la provincia con menor densidad de población en Catalunya (IDESCAT, 2012). La única localidad con más de 20.000 habitantes es la capital, Lleida, ciudad que concentra el 30,84% de la población. La provincia de Lleida cuenta con 13 comarcas: Alta Ribagorça, Alt Urgell, Cerdanya (mitad occidental), Garrigues, Noguera, Pallars Jussà, Pallars Sobirà, Pla d'Urgell, Segarra, Segrià, Solsonès, Urgell y Vall d'Aran. El rango de altitud es muy amplio, oscilando de los pocos metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.), que se pueden encontrar en la zona de la depresión central catalana, hasta los 3.143 m s.n.m. de la Pica d'Estats, el pico más alto de Catalunya y situado en la cordillera Pirenaica, lo que determina la existencia de notables diferencias en una gran diversidad de variables presentes como podrían ser la temperatura, precipitación, vegetación, etc. Se presentan distintos tipos de clima, que van desde el mediterráneo de alta montaña, en las áreas montañosas del norte, hasta el clima continental, en la depresión central. La región mediterránea de Lleida está formada mayoritariamente por los pisos bioclimáticos

mesomediterráneo y supramediterráneo, mientras que en el Pre-Pirineo y Pirineo se presentan los pisos bioclimáticos montano, colino, subalpino y alpino, característicos de la región media de Europa (Alcaraz 2011; Rivas-Martínez, 1983).

La comarca del **Pallars Sobirà** (42°24'N, 1°7'E), donde se ha profundizado en algunos aspectos epidemiológicos del estudio, tiene una superficie de 1.378km² y está localizada en la cadena montañosa de los Pirineos. Su baja población está concentrada en pequeñas localidades (5,5 habitantes /km²) (IDESCAT, 2012). El rango altitudinal presente en el área de estudio oscila entre los 600 y 3.143 m s.n.m. y el clima es mediterráneo de alta montaña, con inviernos fríos y húmedos y veranos cálidos. La media anual de precipitación varía de los 700mm en las zonas de valles hasta los 1.000 mm en los picos. El verano es la estación más lluviosa mientras que en invierno las precipitaciones suelen ser en forma de nieve. La orografía de la región y su clima particular determinan notablemente su vegetación formada por cinco estratos diferentes: el estrato basal (de 600 a 1.000 m s.n.m.) con bosques de robles mixtos, el estrato montañoso (de 1.000 a 1.600 m s.n.m.) con robles, hayas, abetos y pinos rojos, el estrato subalpino (de 1.600 a 2.200 m s.n.m.) con pinos negros, el estrato alpino (de 2.200 a 2.800 m s.n.m.) con pastos y el estrato nival (por encima de los 2.800 m s.n.m.) muy rocoso y con algo de hierba.

El principado de **Andorra**, delimitado por las coordenadas 42°29'N y 1°24'E; 42°25'N y 1°30'E; 42°34'N y 1°47'E; 42°39'N y 1°29'E, es un pequeño país europeo de 468 km² localizado en los Pirineos. Limita con España y Francia y se divide en siete áreas administrativas que reciben el nombre de parroquias, concretamente son: Andorra la Vella, Canillo, Encamp, Escaldes-Engordany, La Massana, Ordino y Sant Julià de Lòria. Su población alcanza los 78.115 habitantes (167,9 habitantes/km²) (Govern Andorra, 2012). Se caracteriza predominantemente por la presencia de montañas escarpadas. Su punto más bajo se encuentra a 840 m s.n.m., en el sur del valle de Gran Valira, y el más elevado a 2.946 m s.n.m. que pertenece al pico Coma Pedrosa. Se caracteriza por presentar clima mediterráneo de alta montaña con temperaturas frías en invierno, veranos templados y considerables variaciones en función de la altitud y la orientación. La vegetación se distribuye en tres pisos altitudinales con la presencia de encinas y robles hasta los 1.200 m s.n.m., el predominio del pino silvestre hasta los 1.600-1.700 m s.n.m. y del pino negro hasta los 2.200-2.300 m s.n.m., sustituido en las cumbres por los prados alpinos. Los pisos bioclimáticos que la conforman son el alpino, subalpino, montano y colino, correspondientes a la región media de Europa.

3.2 ESTUDIO ENTOMOLÓGICO

3.2.1 CAPTURA DE FLEBOTOMOS

Las capturas de los flebotomos se realizaron durante julio de 2006 en toda la provincia de Lleida y en julio de 2007 en el principado de Andorra.

Como método de captura se utilizó el de las trampas adhesivas que fueron colocadas en los lugares de reposo de los flebotomos adultos (mechinales y agujeros no abiertos, oscuros, profundos y no sometidos a corrientes de aire en muros, paredes de casas, cuevas, hendiduras del terreno, etc.) (Killick-Kendrick 1983; Rioux y col., 1967) (ver Anexos 3 y 4).

Las trampas adhesivas consisten en láminas de papel blanco, en nuestro caso de 20x20cm, impregnadas en aceite de ricino purificado para que los flebotomos queden adheridos al entrar o salir de los lugares de reposo. Las propiedades del aceite de ricino lo convierten en un medio ideal para esta finalidad, dado que posee una excelente viscosidad, confiere una buena conservación de los ejemplares, es soluble en alcohol de 95° (lo que permite recuperar de manera sencilla los diferentes ejemplares para su posterior identificación) y, además, reduce el poder atractivo de posibles depredadores (hormigas, roedores, gasterópodos, etc.).

Se trata de trampas denominadas de intercepción sin atracción. Los papeles adhesivos son un tipo de trampa económica y fácil de manufacturar, pueden ser preparadas en grandes cantidades y conservadas hasta ser requeridas (Alexander, 2000).

De acuerdo a la metodología acordada en el proyecto EDEN, las trampas se recogían cuatro días después de la puesta y se guardaban en papel sulfurado, lo que permite una correcta conservación evitando la desecación de los ejemplares de flebotomos, y facilitando el transporte hasta el laboratorio. Los papeles se recogían agrupados por estaciones y se rotulaban con el número de estación de captura, fecha de puesta y recolección y número de papeles recogidos. Una vez en el laboratorio se procedía a la recogida y fijación de los ejemplares capturados (ver Anexo 5).

De 5.044 trampas colocadas en las dos áreas de estudio, se recuperaron un total de 4.574 papeles adhesivos (4.100 y 474 en Lleida y Andorra, respectivamente) representando una superficie de adhesión de 365,9 m² (328 m² en Lleida y 37,9 m² en Andorra) repartidos en 378 estaciones (339 en Lleida y 39 en Andorra), situadas en un rango de altitud entre 0 y 3.143m s.n.m. Debido a la extensión y a las características físicas de la región, muy

montañosa en algunas áreas, las capturas se realizaron mediante transectos siguiendo las principales carreteras con el fin de cubrir toda el área (Rioux y col., 1967).

3.2.2 RECOLECCIÓN, FIJACIÓN, MONTAJE E IDENTIFICACIÓN

En el laboratorio, se procedió a la recuperación de los flebotomos, con la ayuda de un pincel embebido en alcohol de 95°, para su fijación en viales que contenían alcohol de 95°, que elimina los restos de aceite (ver Anexo 5). Al cabo de una semana se procedió a cambiar el alcohol de 95° por alcohol de 70°. Posteriormente, se procedió a la identificación de los ejemplares en la lupa binocular mediante la morfología de la pinza genital en el caso de los machos y de la presencia de cibario en el caso de las hembras como rasgo distintivo de *Sergentomyia minuta*. Con el resto de las hembras, pertenecientes al género *Phlebotomus*, se procedió al montaje en líquido de Hoyer, método rápido y que clarifica bien la genitalia. La identificación específica se realizó con el microscopio óptico, a través de la observación de la morfología de las espermatecas, siguiendo las claves de Gállego Berenguer y col. (1992) (ver Anexo 6).

3.3 ESTUDIO SOBRE LA LEISHMANIOSIS CANINA

3.3.1 CUESTIONARIO VETERINARIO SOBRE LA LEISHMANIOSIS CANINA

Un total de 41 cuestionarios fueron enviados en 2009 a todos los veterinarios de la provincia de Lleida con clínica veterinaria de pequeños animales, con la finalidad de conocer su opinión sobre la evolución de la prevalencia y el uso de medidas de control de la leishmaniosis canina. El cuestionario fue diseñado por los miembros del proyecto EDEN y consistía en dos páginas con preguntas sobre distintos aspectos relativos a la enfermedad (ver Anexo 7).

Previamente, fue organizada una conferencia informativa con ayuda del *Col.legi Oficial de Veterinaris de Lleida* con la finalidad de animar a los veterinarios a participar en el estudio. Los cuestionarios fueron enviados por correo convencional en un sobre con vuelta previo pago y también vía correo electrónico. Una segunda carta, seguida de una llamada telefónica, fue enviada en caso de no recibir respuesta alguna.

3.3.2 ESTUDIO SEROLÓGICO DE LOS PERROS. RECOGIDA Y PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Se llevó a cabo un estudio serológico transversal en octubre de 2009 en la comarca del Pallars Sobirà. Fue necesario realizar una búsqueda activa de los dueños de los perros con la ayuda de un veterinario de la zona.

Los perros pertenecían a 25 dueños de 16 localidades, situadas entre los 600 y los 1.300 m s.n.m., obteniéndose muestras de sangre de 145 animales mediante punción de la vena cefálica. La sangre fue recogida en tubos de 5ml que se centrifugó a temperatura ambiente el mismo día. Los sueros se congelaron a -40°C hasta su posterior utilización.

Las muestras obtenidas fueron analizadas por cuatro técnicas serológicas distintas: un *in-house enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), un *in-house immunofluorescent antibody test* (IFAT), un *in-house Western Blot* (WB) y un test inmunocromatográfico comercial (ICF). (Aisa y col., 1998; Alvar y col., 2004; Iniesta y col., 2007; Riera y col., 1999). Las animales fueron considerados seropositivos y probablemente infectados cuando presentaron por lo menos dos pruebas positivas (Iniesta y col., 2002).

Además, se formuló una encuesta al propietario del animal donde se registraban distintas variables referentes tanto a características del propio animal como sobre la percepción de la enfermedad y el uso de medidas preventivas. En la ficha se recogieron también los signos clínicos de los perros tras el examen del veterinario.

3.4 RECOGIDA Y ORIGEN DE LOS DATOS

Tanto en el estudio entomológico como en el de la leishmaniosis canina, los datos referentes a las estaciones de muestreo, los dueños y las características de los perros fueron recogidos tanto en papel como en soporte electrónico con la ayuda de una PDA (Tungsten T5), mediante el uso del programa Pendragon Form v.5.0 (PSC, Libertyville, IL, USA) adaptado a nuestras necesidades gracias al proyecto EDEN.

Las coordenadas geográficas fueron recogidas mediante un GPS (Tom Tom Wireless GPS MK II). Los datos referentes a la climatología de Lleida (temperatura y precipitación) se solicitaron al *Servei Meteorològic de Catalunya* (MeteoCat). A cada estación se le asignaron los datos correspondientes a la estación meteorológica más cercana utilizando la herramienta espacial “join-and-relate” del programa ArcGis v.9.2 (ESRI, Redlands, CA, USA) (ver Anexo

8). Los datos sobre la altitud se extrajeron de un modelo digital de 90m de resolución (Jarvis y col., 2008) con la ayuda del programa ArcGIS 9.2. Se procedió del mismo modo para extraer los datos relativos a los usos del suelo, mediante una capa CORINE de 2,5m de resolución obtenida del Centro Nacional de Información Geográfica, y los pisos bioclimáticos (Rivas Martínez, 1983) asociados a cada estación de muestreo, capa obtenida de un enlace a una página web a través de la Universidad de Granada (<http://www.ugr.es>).

En nuestro caso, hemos utilizado de manera rutinaria es el programa ARCGIS versión 9.2 para lo siguiente: crear capas de puntos a partir de bases de datos georreferenciadas que contenían información de todas las variables estudiadas y sus correspondientes categorías, asignar elementos puntuales al elemento puntual más cercano, calcular distancias entre elementos puntuales, extraer valores de una capa de polígonos a partir de cada elemento de una capa de puntos de modo que cada punto recibe los atributos del polígono donde se encuentra, extraer los valores de una capa ráster para cada punto de manera que cada punto recibe los atributos del píxel que lo contiene, generar mapas de distribución de la enfermedad humana y canina, así como mapas de presencia y densidad de los vectores, relacionándolos a su vez con factores bióticos y abióticos susceptibles de intervenir en la eco-epidemiología de la enfermedad.

3.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

En el estudio **entomológico** se estudió el efecto de diferentes variables sobre la densidad (número de flebotomos por metro cuadrado de trampa adhesiva) de *P. perniciosus* y *P. ariasi* mediante modelos lineales generalizados basados en una distribución binomial negativa. Las variables consideradas en el análisis están detalladas en el capítulo correspondiente del apartado “Resultados”. La transformación exponencial de las estimaciones proporcionadas por estos modelos se interpretan como una razón de tasas de incidencia (*incidence risk ratios, IRR*), como ya ha sido realizado en otros trabajos (Gálvez y col., 2010a). En primer lugar, la asociación de todas las covariables y la variable respuesta fueron evaluadas, una por una, mediante análisis bivariante para cada vector por separado. En un segundo paso, aquellas covariables con un p-valor ≤ 0.2 fueron además evaluadas en un modelo multivariado también por separado (Gálvez y col., 2010a). Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa R libre (R Development Core Team, 2012).

En el estudio de la **leishmaniosis canina** se utilizó un modelo de regresión logística mixto para evaluar la relación entre la seropositividad en los perros (variable respuesta) y una serie de variables individuales y de localización (covariables). Las localidades donde vivían los perros se utilizaron como efecto aleatorio para tener en cuenta la agrupación de los datos (Alonso y col., 2010), y se aplicó la estimación de máxima verosimilitud. Las variables consideradas en el análisis están detalladas en el capítulo correspondiente del apartado “Resultados”. Se realizó un modelo de dos fases para determinar el modelo multivariado más adecuado. En primer lugar, la asociación de todas las covariables y la variable de respuesta fueron evaluadas, una por una, mediante análisis bivariante. Aquellas covariables con un p-valor ≤ 0.2 fueron además evaluadas en un modelo multivariado mixto (Gálvez y col., 2010b). En este segundo paso, se usó un método de regresión con eliminación progresiva para seleccionar el modelo final utilizando un p-valor ≤ 0.05 como umbral de eliminación. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Stata (versión 12) (StataCorp LP, College Station, Texas, USA).

4. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain

¿LA LEISHMANIOSIS SE ESTÁ EXTENDIENDO EN ESPAÑA? PRIMEROS DATOS
SOBRE LA LEISHMANIOSIS CANINA EN LA PROVINCIA DE LLEIDA, CATALUNYA,
NORESTE DE ESPAÑA

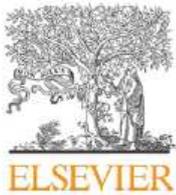
Cristina Ballart, Maria Magdalena Alcover, Montserrat Portús y Montserrat Gállego.

TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE 2012, Vol. 106, p. 134-136.

RESUMEN

La leishmaniosis canina es una enfermedad ampliamente distribuida presente en 42 países. Está considerada de importancia epidemiológica por el papel del perro como reservorio de la leishmaniosis humana. El conocimiento de la distribución real de la leishmaniosis canina y su emergencia y/o re-emergencia es de gran importancia a la hora de determinar la extensión de la enfermedad.

El presente trabajo reporta la detección de un caso de leishmaniosis canina en una granja localizada en un área Pirenaica del noroeste de Catalunya (España), donde la enfermedad era previamente desconocida. El hecho de que el perro nunca se hubiera movido de la zona de estudio y la presencia de las especies vectoras en la granja, *Phlebotomus ariasi* y *P. perniciosus*, hacen que el caso sea considerado como autóctono siendo el primero publicado en ésta región de España.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/trstmh>

Short Communication

Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain

C. Ballart^{a,b}, M.M. Alcover^{a,b}, M. Portús^a, M. Gállego^{a,b,*}^a *Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain*^b *Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Barcelona, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2011

Received in revised form 3 November 2011

Accepted 3 November 2011

Available online 2 December 2011

Keywords:

Canine leishmaniasis

Autochthonous

Leishmania infantum

Pyrenees

Lleida

Spain

ABSTRACT

Canine leishmaniasis (CanL) is a widespread disease present in 42 countries. It is considered of epidemiological importance because of its role as a reservoir of human leishmaniasis. Knowledge of the real distribution of CanL and its emergence and/or re-emergence is of great importance in order to determine the extension of the disease. This work reports the detection of CanL in a farm dog located in a Pyrenean area of northwest Catalonia (Spain) where the disease was previously unknown. Since the dog had never left the region and sandfly vectors, *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus*, were present in the farm the case is considered as autochthonous and is the first to be published in this region of Spain.

© 2011 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Canine leishmaniasis (CanL) is a widespread disease present in 42 countries in Europe, Africa, Asia and America, and suspected in three other countries of Africa.¹ In Spain, although considered as a notifiable disease, the lack of official data makes it difficult to obtain realistic figures on its distribution and prevalence. A characteristic of the disease is the heterogeneity of the foci, with seroprevalences ranging from 0 to 34%.² No data on CanL have been recorded in the northwest Catalan Pyrenees (Lleida province), while in other parts of Catalonia the seroprevalence in random dog populations are up to 10%.³ Five human leishmaniasis (HL) cases were recorded in the northwest areas from 1982 to 2009.^{3,4}

Most CanL infections in Spain are asymptomatic. Both sick and asymptomatic dogs are the main reservoirs of the parasite and represent a risk for humans.¹ Transmission

of *Leishmania* is mainly by the bite of sandfly vectors. In Spain, two species are proven vectors, *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus*.^{3,5}

During entomological studies carried out in the Catalan Pyrenees we located a farm with three dogs, one of whom showed suspected signs of CanL. In this paper we describe this finding and discuss the possibility of the emergence of CanL in an area where it was previously unknown.

2. Materials and methods

2.1. Animals and samples

Three mixed-breed dogs living in a farm located at 953 m a.s.l. (Lleida province, NE Spain, 42° 32.1645 N, 1° 16.8501 E; Figure 1) were analyzed. The habitat was an isolated cattle farm with the presence of other animals such as cats and rabbits. The climate is high-mountain Mediterranean and the vegetation is mainly composed of mixed oaks. The dogs were born on the farm and never left it.

* Corresponding author. Tel.: +34 934024502; fax: +34 934024504.
E-mail address: mgallego@ub.edu (M. Gállego).

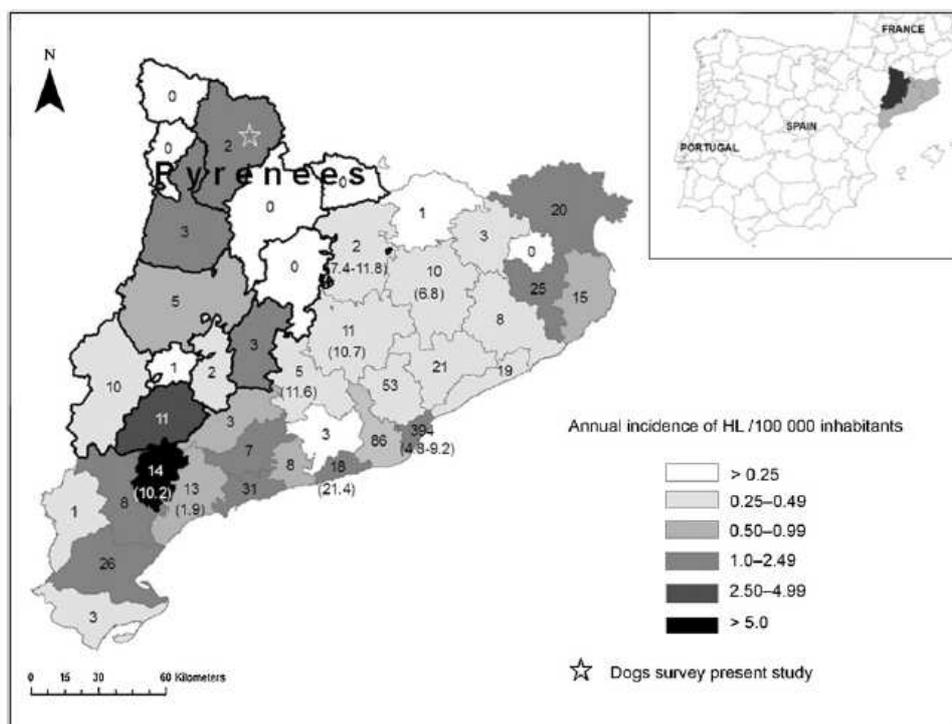


Figure 1. Distribution of human and canine leishmaniasis in Catalonia and location of the farm studied. Human data recorded from *Butlletí Epidemiològic de Catalunya* (1983–2010) (annual incidence rate was calculated from the number of cases declared during 1982–2009 and the census of 1996 (modified from Portús et al.³). The numbers included in the different counties represent number of human leishmaniasis cases during 1982–2009 and, in brackets, existing seroprevalence data on canine leishmaniasis.³ Counties from Lleida province are delimited in a bold black line.

Samples of peripheral blood were obtained by cephalic vein puncture with the agreement of the owners. Popliteal lymph node aspiration was performed on one dog.

2.2. Diagnostic techniques

The dogs were analyzed by two serological techniques, an ELISA and a western blot (WB), performed as described elsewhere with some modifications.⁶ For the ELISA test sonicated promastigotes of an autochthonous *Leishmania infantum* strain were used at a protein concentration of 20 µg/ml in 0.05 M carbonate buffer at pH 9.6, the sera were diluted to 1:400 in phosphate-buffered saline-tween 1% milk (Sigma, St Louis, MO, USA) and Protein A peroxidase (Sigma) (1:30 000) was used as second antibodies. The reaction was quantified in units (U) by reference to a positive serum arbitrarily set at 100U. The cut-off was established at 20U. For the WB, a concentration of 3 × 10⁸ promastigotes/ml in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.01 M EDTA, 5% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.0125 bromophenol blue) boiled for 5 min was used as antigen. Electrophoresis was performed on 0.1% SDS-12% polyacrylamide gel. Polypeptides were trans-blotted onto nitrocellulose sheets (Millipore, Bedford, USA). The sera were diluted to 1:50 in tris-buffered saline-tween 1% milk (Sigma) and Protein A peroxidase (1:1 000) was used as second antibodies. The reaction was considered positive when any of the bands of 14, 16, 18 and 24 kD were present.

Culture of the popliteal lymph node was carried out in Schneider's insect medium supplemented with 20%

heat-inactivated fetal calf serum and gentamicine (25 µg/mL) and in Novy-McNeal-Nicolle's medium and incubated at 24–26 °C.⁶ The dog owners only gave authorization to carry out the culture in the dog they considered to be ill. The isoenzymatic characterization was performed in starch gel using 15 enzymic loci.⁷

3. Results and Discussion

Two dogs were asymptomatic and the third had physical signs compatible with CanL, including alopecia, furfuraeous dermatitis, conjunctivitis, onychogryphosis and lymphadenopathy. The symptomatic dog tested positive by serology and culture and was considered to be infected (Table 1). The isolated strain (MCAN/ES/2007/BCN-759) was identified by isoenzymatic characterization as *L. infantum* zymodeme MON-1. The other two asymptomatic dogs had ELISA titres near the cut-off that were not confirmed by WB and were considered not infected. No culture was performed on these dogs.

Table 1
Characteristics of the dogs and diagnostic results

Age, years	Symptomatology	ELISA (titre)	WB (bands)	Culture, PLN
1	No	Neg (18.6 U)	Neg	NP
3	No	Pos (34.2U)	Neg	NP
6	Yes	Pos (272.1U)	Pos (14, 16)	Pos

NP: Not performed; PLN: Popliteal lymph node; WB: Western blot.

A PubMed and ISI WEB search using the keywords 'canine leishmaniasis AND (Lerida OR Lleida OR Catalonia OR Pyrenees)' did not find any published case of CanL in the studied area and neither are there any official records. Nevertheless, entomological studies carried out in the area, and on the farm, showed the presence of *P. ariasi* and *P. perniciosus*, which are considered to be a risk for leishmaniasis emergence in temperate Europe.⁵

In the northern counties of Lleida province, which include the Pyrenean area mentioned, there are five official records of HL (Figure 1),^{3,4} one case in each of the years 1982, 1983, 1986, 1996 and 2007. The official data do not include the origin of the patients nor the sanitary centres where the diagnoses were made. Moreover, no data is included regarding the patients' movements within Spain and travel history to other endemic countries. The only published case of HL in the province of Lleida was diagnosed in a hospital far from the Pyrenean area and without any data of travels to other endemic regions.⁸ So the presence of sporadic cases of HL is not conclusive proof of the existence of an autochthonous focus in the area and we can not conclude that cases of human leishmaniasis were present before the finding of the CanL case described here.

Since dogs travel less than humans, particularly dogs from rural areas, CanL is a more accurate marker of the real distribution of leishmaniasis in a territory than HL. The CanL case described here is considered autochthonous as the dog was born in, and never left, the area and is the first published case in this part of Spain. The possibility of the disease wide-spreading from the south of Catalonia or the south of France should be taken into consideration. Based on the opinion of the local veterinarian it can be suspected that CanL is also present in other parts of this Pyrenean region. Future studies are therefore necessary to establish the base of the infection dynamics, one of the objectives of the European EDEN project.

Authors' disclaimers: The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Authors' contributions: CB, MG and MP designed the study protocol; CB, MA and MG carried out the field work;

CB and MA performed the diagnostic techniques, and CB and MG drafted the manuscript. All authors shared in the interpretation of the data, revising the manuscript and all of them approved the final manuscript. CB and MG are guarantors of the paper.

Acknowledgements: The authors would like to thank the owners of the dogs for allowing us to collect the samples and Silvia Tebar for providing technical help.

Funding: This work was supported by grants of Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (AGL2004-06909-C02-01), Department d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Spain) (2009SGR385) and European Union (GOCE-2003-010284 EDEN, Emerging Diseases in a changing European eNvironment) and is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0259 (www.edenfp6project.net). CB was awarded a PhD student grant of the EDEN project.

Conflicts of interest: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- Gállego M. Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis [in Spanish]. *Rev sci tech Off int Epiz* 2004;23:661–76.
- Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1013–8.
- Portús M, Gállego M, Riera C, Fisa R, Aisa MJ, Botet J, et al. A review of human and canine leishmaniosis in Catalonia, and associated vector distribution. *Rev Ibér Parasitol* 2007;67:59–67.
- Generalitat de Catalunya. Epidemiological Bulletin of Catalonia (BEC). 2005–2010 [in Catalan] <http://www.gencat.cat/salut/depsalut/html/ca/dir2263/> [accessed 27 April 2011].
- Ready PD. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2008;27:399–412.
- Riera C, Valladares JE, Gállego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 1999;84:33–47.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Pèrières J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;65:111–25.
- Sacristán O, Porcel JM, Panadés MJ, Rubio M. A 34-year-old man with lingual tumor. Lingual leishmaniasis in a patient with HIV infection [in Spanish]. *Rev Clin Esp* 2001;201:103–5.

CAPÍTULO 2

Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: first finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*

DISTRIBUCIÓN DE FLEBOTOMOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EN ANDORRA: PRIMER
HALLAZGO DE *P. PERNICIOSUS* Y AMPLIA
DISTRIBUCIÓN DE *P. ARIASI*

Cristina Ballart, Sergio Barón, Maria Magdalena. Alcover, Montserrat Portús, Montserrat Gállego

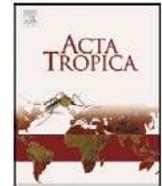
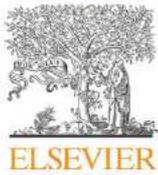
ACTA TROPICA 2012, Vol. 122, p. 155-159.

RESUMEN

Durante Julio de 2007 se llevaron a cabo capturas de flebotomos en Andorra mediante la utilización de trampas adhesivas embebidas en aceite de ricino y depositadas en los lugares de reposo de los mismos durante cuatro noches consecutivas. Las estaciones de muestreo se localizaron entre los 800 y los 2400 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.).

Se capturaron ejemplares pertenecientes a dos especies del género *Phlebotomus* subgénero *Larrossius*, *Phlebotomus ariasi* y *Phlebotomus perniciosus*. Los resultados muestran información nueva sobre la amplia distribución geográfica y altitudinal de *P. ariasi* en Andorra, especie localizada entre los 800 y los 2200 m s.n.m. Durante el estudio también se capturó, por primera vez en Andorra, a *P. perniciosus* por debajo de los 1000 m s.n.m.

El hallazgo de estas dos especies, ambas vectoras probadas de la leishmaniosis humana y canina en las zonas fronterizas de Francia y España, está considerado en términos de riesgo de una posible emergencia de la enfermedad en Andorra, como ha ocurrido en otras partes de Europa.



Short communication

Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*C. Ballart^{a,b}, S. Barón^c, M.M. Alcover^{a,b}, M. Portús^a, M. Gállego^{a,b,*}^a Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain^b Barcelona Center for International Health Research (CRESIB), Barcelona, Spain^c Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus Universitario Cartuja, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2011

Received in revised form

11 November 2011

Accepted 21 November 2011

Available online 1 December 2011

Keywords:

*Phlebotomus ariasi**Phlebotomus perniciosus*

Andorra

Leishmaniasis

ABSTRACT

During July 2007 sand fly captures were carried out in Andorra using sticky castor oil traps set in sand fly resting places for four consecutive nights. The sampling stations were located between 800 and 2400 m above sea level. The specimens captured belong to two species of the genus *Phlebotomus* subgenus *Larrousius*, *Phlebotomus ariasi* and *Phlebotomus perniciosus*. The results shed new light on the wide geographical and altitudinal distribution of *P. ariasi* in Andorra, where it was located between 800 and 2200 m a.s.l. The study also identified *P. perniciosus* in Andorra for the first time, with captures below 1000 m a.s.l. The finding of these species, both proven vectors of human and canine leishmaniasis in the bordering areas of France and Spain, is considered in terms of a possible emergence of leishmaniasis in Andorra, as has occurred in other parts of Europe.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Leishmaniasis is a transmissible disease that affects man and other mammals and is caused by different species of the genus *Leishmania*. Various factors, linked to both human activity and climate change, have influenced its distribution and leishmaniasis is currently considered as an emerging or re-emerging disease in some parts of the world (Gállego, 2004; Ready, 2010).

The highly specialized transmission is by the bite of hematophagous insects acting as vectors, and is restricted to a group of dipterans, the phlebotomine sand flies (Rioux et al., 1967; Gállego, 2004), which are found mainly in warm parts of the world (Killick-Kendrick, 1999). In the European Mediterranean region, five species of the genus *Phlebotomus* subgenus *Larrousius* are proven vectors of the human and canine disease caused by *Leishmania infantum* (*Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus perfiliewi*, *Phlebotomus neglectus* and *Phlebotomus tobbi*) (WHO, 2010).

In Western Europe, human and canine leishmaniasis are considered highly endemic in some parts of Portugal, Spain, France and Italy, where in the last years they have spread to northern

regions (Maroli et al., 2008), being detected in areas considered non-classical for the disease (Dereure et al., 2009; Ballart et al., 2012) and at an increasing rate in classical areas (Martín-Sánchez et al., 2009; Gálvez et al., 2010). Some autochthonous cases have also been observed in other European countries (Bogdan et al., 2001). No data exist for leishmaniasis in Andorra, a small country in the Pyrenees located between two endemic countries, Spain and France. The only existing report on the phlebotomine fauna in this country describes the survey of one collection site and identification of two sand fly species, *Sergentomyia minuta* and *P. ariasi* (Lucientes et al., 2001).

The present work represents an intensive entomological survey carried out in Andorra. The results are discussed in terms of the possibility of an emergence of leishmaniasis in the country.

2. Materials and methods

Andorra is a small European country of 468 km² located in the Pyrenees, bordering with France to the North and East, and Spain to the South and West, and is divided into seven administrative parishes. Andorra consists predominantly of rugged mountains with the lowest point at 840 m a.s.l., in the southern basin of the Gran Valira, and the highest at the 2946 m Coma Pedrosa peak. It is characterized by a Mediterranean high mountain climate with cold temperatures in winter, mild summers and considerable variations depending on altitude and orientation. It is considered an ecoregion of Pyrenees conifer and mixed forests.

* Corresponding author at: Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 934024502; fax: +34 934024504.

E-mail address: mgallego@ub.edu (M. Gállego).

An entomological survey was carried out in 39 stations of Andorra during July 2007 using sticky traps (20 cm × 20 cm sheets of papers covered in castor oil) set in adult sand fly resting places and left for four days. Due to the highly mountainous topography of the region, captures were made along transects (Rioux et al., 1967), following all the main roads (Table 1). The sticky traps were recovered and grouped according to sampling site and date of capture. The sand flies were fixed in 95° alcohol for a minimum of 2 days to eliminate the oil, and then definitively conserved in 70° alcohol until morphological identification following the keys of Gállego Berenguer et al. (1992).

The characteristics of the sampling stations (Table 1) were collected in a PDA (Palm Tungsten T5) using Pendragon Form v.5.0 software and a GPS (Tom Tom Wireless GPS MK II) to record the geographical coordinate. Altitude data for each geocoded site were extracted from a 90 m resolution CGIAR Digital Elevation Model (Jarvis et al., 2008) using ArcGIS 9.2 software.

3. Results

The majority of traps was placed in drain embankments (94.9%) alongside paved roads (87.2%), whilst others were placed in unpaved tracks and in natural or other kinds of walls. 561 sticky traps were placed in the 39 stations studied and 474 recovered, which represents a recovery of 84.5% of traps and a surface of adhesion of 37.92 m².

A total of 21 specimens belonging to two species of the genus *Phlebotomus* subgenus *Larroussius*, *P. ariasi* (5 females, 13 males) and *P. perniciosus* (1 female, 2 males) were captured in the 10 stations found positive for sand flies. The global density of the two species was 0.47 specimens/m² for *P. ariasi* and 0.08 specimens/m² of sticky trap for *P. perniciosus*. The characteristics of the positive stations and vector density are summarized in Table 1. Global quantitative results of density, abundance and frequency, according to altitudinal distribution, are summarized in Table 2. All the positive stations consisted of drainage holes in embankments of stone with mortar, located in paved roads and at different sites relative to settlement, altitude, aspect and vegetation. *P. perniciosus* was captured in only two stations, both in the same parish (Sant Julià de Lòria) at altitudes below 1000 m a.s.l., which represents a frequency of 5.13%. *P. ariasi* was captured in 9 stations located in 6 parishes at a frequency of 23.08% and at altitudes from 869 m to 2141 m a.s.l. The geographical distribution of the sampling sites and the density of *P. ariasi* and *P. perniciosus* are represented in Fig. 1. *P. perniciosus* is restricted to the south whilst *P. ariasi* covers a wide area.

4. Discussion

The only previously reported data on sand flies in Andorra concerns the capture of *P. ariasi* and *S. minuta* in 1993 in a single sampling site at 1050 m a.s.l. using a Malaise trap.

The number of sand flies captured was 7 and 3 specimens, respectively (Lucientes et al., 2001). In the present study we used sticky traps since they are suitable for a study requiring captures over an extensive area and short period of time. This method also has the advantage of trapping by interception, rather than attraction, which provides a more realistic idea of sand fly distribution within a territory and facilitates the comparison of results between stations. The traps lose adhesivity after four days which is considered long enough to obtain good results (Rioux et al., 1967, 1969).

The number of sand flies captured was low, despite the sunny weather throughout the capture period. As in the aforementioned entomological study, we also captured *P. perniciosus* but *S. minuta* was absent, as were other species of sand flies found in neighbouring Spain and France, *Phlebotomus mascittii*, *Phlebotomus sergenti*

Table 1
Characteristics of the positive stations for sand flies and density of *P. ariasi* and *P. perniciosus*.

Administrative division (parròquia)	Closest locality	Site relative to settlement	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Aspect	Natural vegetation	<i>P. ariasi</i> density	<i>P. perniciosus</i> density
Canillo	Canillo	Edge	42° 33.9338N	001° 35.6042E	1528	SE	Mixed oak	1.92	0
Canillo	Pas de la Casa	Edge	42° 32.7145N	001° 43.8446E	2141	SE	Mountain meadow	2.27	0
Encamp	Les Bordes de Lloset	Edge	42° 32.3899N	001° 35.5127E	1362	NW	Mixed oak	2.78	0
Escaldes-Engordany	Les Escaldes	Between	42° 31.0562N	001° 33.3328E	1198	NW	Mixed oak	4.17	0
La Massana	La Massana	Edge	42° 32.805N	001° 30.8748E	1256	SW	Alder valley	1.79	0
Ordino	Ordino	Between	42° 33.6859N	001° 31.8189E	1284	SW	Mountain pine	8.33	0
Ordino	Ordino	Within	42° 33.3442N	001° 32.0661E	1306	S	None	0.96	0
Ordino	Arans	Within	42° 35.0934N	001° 31.0979E	1392	E	Mountain pine	2.34	0
Sant Julià de Lòria	Sant Julià de Lòria	Between	42° 26.4724N	001° 28.6671E	869	NW	Evergreen oak	0.96	1.92
Sant Julià de Lòria	Sant Julià de Lòria	Edge	42° 29.0699N	001° 29.3778E	950	NE	Mixed oak	0	4.17

Table 2
Number, density (no. of sand flies/m²), abundance (%) and frequency (%) of sand fly species at different altitudinal ranges in Andorra.

Altitude (m)	No. of stations	Surface (m ²)	Number		Density		Abundance (%)		Frequency (%)	
			<i>P. ariasi</i>	<i>P. perniciosus</i>						
801–1000	2	1.28	1	3	0.78	2.34	5.56	100	2.56	5.13
1001–1200	2	0.88	1	0	1.14	0	5.56	0	2.56	0
1201–1400	7	7.68	12	0	1.56	0	66.67	0	12.82	0
1401–1600	7	8	2	0	0.25	0	11.12	0	2.56	0
1601–1800	6	5.6	0	0	0	0	0	0	0	0
1801–2000	5	4.08	0	0	0	0	0	0	0	0
2001–2200	5	5.76	2	0	0.35	0	11.12	0	2.56	0
2201–2400	5	4.64	0	0	0	0	0	0	0	0

Density: number of sand flies per square metre of sticky trap. Abundance: relative number of sand flies captured at a specific range related to the total number of sand flies captured and expressed in percentage. Frequency: relative number of positive stations at a specific range related to the total number of stations and expressed in percentage.

and *Phlebotomus papatasi* (Rioux et al., 1969; Gállego et al., 1990). The Mediterranean high mountain climate of Andorra, which has a minimum altitude of 840 m a.s.l., could explain the absence of these 3 species, which have sub-Mediterranean, semi-arid and arid affinities, respectively, and are typically found at altitudes of below 800 m a.s.l. Nevertheless, the absence of *S. minuta* in sticky trap captures is unusual, given that this is normally the most abundant and dense species reported in this kind of trap (Gállego et al., 1990) and in Europe is found at altitudes from 25 to 2490 m (Rioux et al., 1969; Barón et al., 2011).

An important factor in the distribution of sand flies could be the altitude and accompanying differences in bioclimate and vegetation. In the present study sand fly distribution varied notably between sampling sites according to altitude. *P. ariasi* showed a wide altitudinal range in Andorra, being captured between 800 m and 2200 m a.s.l. (highest point at 2141 m a.s.l.), whilst *P. perniciosus* was not located above 1000 m a.s.l. Sand flies around the world are found from below sea level to 3300 m a.s.l. (Killick-Kendrick, 1999), but in temperate regions they do not usually occupy sites

over 1000–1500 m a.s.l. (Izri et al., 2006). In Europe, the altitudinal distribution of *P. ariasi* ranges from 10 m to 2168 m (Rioux et al., 1969; Martínez-Ortega, 1985) and our observation is the second for this species at over 2000 m a.s.l., after the finding at Calar Alto (Almería, SE Spain). In Europe, *P. perniciosus* occupies sites from sea level to 1534 m (Rioux et al., 1969; Barón et al., 2011) but in Andorra the highest point of capture was at 950 m, in two sites of the same parish, Sant Julià de Loria (Table 2). The results obtained in Andorra are in agreement with the predominant presence of *P. ariasi* in humid or sub-humid areas with cold winters, being the only potential vector of leishmaniosis in cold zones, and the preference of *P. perniciosus* for semi-arid or sub-humid zones with warm winters and mild summers (Gállego et al., 1990; Aransay et al., 2004). The maximum altitudinal distribution of *P. ariasi* and *P. perniciosus* varies among western European countries (Table 3). Spain is where they have shown the greatest altitudinal level whilst in France and Italy these sand flies are not present at high altitudes in the northern regions or they are substituted by other species.

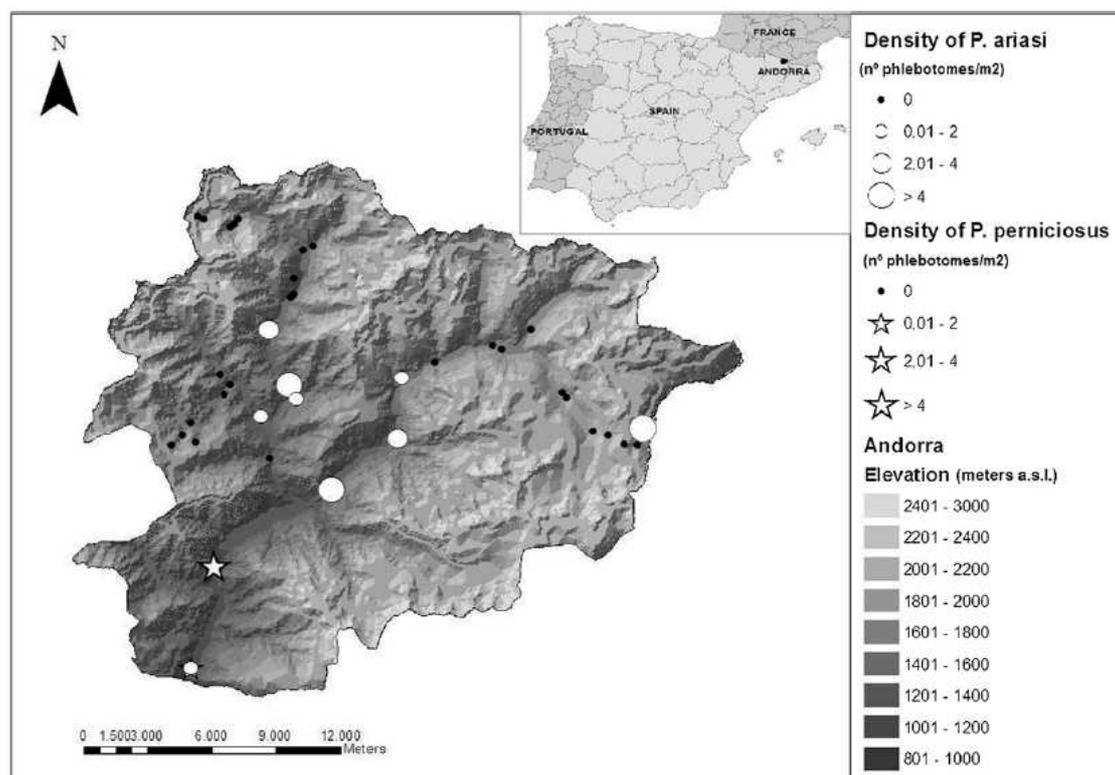


Fig. 1. Sampling sites in Andorra showing the presence/absence of *P. ariasi* and *P. perniciosus* and its ranges of density.

Table 3
Maximal altitudinal level (metres above sea level) for captures of *P. ariasi* and *P. perniciosus* in Western European countries.

Country	<i>P. ariasi</i>	<i>P. perniciosus</i>	Reference
Portugal	703	703	Alves-Pires and Ribeiro (1991)
Spain	2168	1534	Martínez-Ortega (1985) and Barón et al. (2011)
France	1415	640	Rioux et al. (1969)
Italy	870	1070	Maroli et al. (1991, 1997)
Andorra	2141	950	Present study

Until now, leishmaniasis in Europe caused by *L. infantum* was considered to be present mainly in the Mediterranean Basin, ranging from Portugal in the West to Greece in the East. Nevertheless, in recent years the disease has become not only increasingly prevalent in Mediterranean endemic areas but is also spreading and emerging in other zones previously considered leishmaniasis-free, with reports of new foci in areas such as northern Italy (Bogdan et al., 2001; Maroli et al., 2008; Dereure et al., 2009; Martín-Sánchez et al., 2009; Gálvez et al., 2010). The presence of human and canine leishmaniasis has been reported in other northern and eastern countries of Europe, although some are considered imported cases (Aspöck et al., 2008). No data exists on the presence of leishmaniasis in Andorra, which is located between the known foci of the Pyrenean regions of France (Pratlong et al., 2004; Dereure et al., 2009) and Spain, where an autochthonous case of canine leishmaniasis has been recently described in the neighbouring area of Lleida province (Ballart et al., 2012).

Our entomological survey has allowed us to describe the presence of *P. perniciosus* in Andorra for the first time and gain insight into the wide geographical and altitudinal distribution of *P. ariasi* in this country. Both species are responsible for the transmission of *L. infantum* in bordering France and Spain (Dereure et al., 2009; Gállego et al., 1990).

The presence of the vector is considered to be a risk factor for the emergence of leishmaniasis in temperate Europe (Ready, 2010). We therefore consider Andorra to be an area of risk for the emergence of the disease if infected humans and/or dogs are present during the transmission period despite the low sand fly densities. The summer temperature in Andorra would allow the parasites in the vectors to complete their life cycle and be transmitted to the vertebrate hosts, as has been experimentally demonstrated for *P. ariasi*, the most widespread species in Andorra (Rioux et al., 1967).

As reports of abundance and density of sand flies, particularly *P. ariasi*, have varied according to the capture methods used (Gállego Berenguer et al., 1992), it is recommended that, after this preliminary study, entomological studies continue using CDC traps in the locations found positive for sand flies. More accurate data on the real distribution and density of this species would also be obtained if further studies were conducted in the presence of humans and dogs at different times throughout the summer. Surveillance of dogs arriving from other endemic areas is advisable in order to avoid or control the possible establishment of the disease in Andorra.

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (AGL2004-06909-C02-01), Department d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Spain) (2009SGR385) and European Union (GOCE-2003-010284 EDEN, Emerging Diseases in a changing European Environment) and is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0264 (www.edenfp6project.net). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

References

- Alves-Pires, C., Ribeiro, H., 1991. The phlebotomine sandflies of Portugal V—observations on the ecology of the vectors of leishmaniasis in the Alto Douro region. *Parassitologia* 3, 63–68.
- Aransay, A.M., Testa, J.M., Morillas-Márquez, F., Lucientes, J., Ready, P.D., 2004. Distribution of sand fly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol. Res.* 94, 416–420.
- Aspöck, H., Gerersdorfer, T., Formayer, H., Walochnik, J., 2008. Sand flies and sand fly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wien. Klin. Wochenschr.* 120, 24–29.
- Ballart, C., Alcover, M.M., Portús, M., Gállego, M., 2012. Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 134–136.
- Barón, S.D., Morillas-Márquez, F., Morales-Yuste, M., Díaz-Sáez, V., Irigaray, C., Martín-Sánchez, J., 2011. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* 138, 1234–1244.
- Bogdan, C., Schönian, G., Bañuls, A.L., Pratlong, M.H., Lorenz, F., Rölinghoff, E.M., Mertens, R., 2001. Visceral Leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 32, 302–306.
- Dereure, J., Vanwambeke, S., Malé, P., Martínez, S., Pratlong, F., Balard, Y., Dedet, J.P., 2009. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector-borne Zoonot.* 9, 687–694.
- Gállego Berenguer, J., Botet Fregola, J., Gállego Culleré, M., Portús Vinyeta, M., 1992. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. In: Hernández, S. (Ed.), *In Memoriam al Prof. Dr. D. F. de P. Martínez Gómez*. Publicaciones de la Universidad de Córdoba, pp. 581–600.
- Gállego, M., Rioux, J.A., Rispaill, P., Guilvard, E., Gállego, J., Portús, M., Delabre, A., Bastien, P., Martínez-Ortega, E., Fisa, R., 1990. Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Rev. Ibér Parasitol.* 50, 123–127.
- Gállego, M., 2004. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis. *Rev. Sci. Tech. OIE* 23, 661–676.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E., Molina, R., 2010. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet. Parasitol.* 169, 327–334.
- Izri, A., Depaquit, J., Parola, P., 2006. Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du Bassin Méditerranéen. *Med. Trop.* 66, 429–435.
- Jarvis, A., Reuter, H.I., Nelson, A., Guevara, E., 2008. Hole-Filled Seamless SRTM Data V4. International Centre for Tropical Agriculture (CIAT), Available from <http://srtm.csi.cgiar.org>.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289.
- Lucientes, J., Zárata, J.J., Arbea, J.I., Carles-Tolrà, M., Pujade-Villar, J., 2001. Primeras citas de flebotominos (Diptera: Psychodidae) para Andorra. *Boletín S.E.A.* 28, 129–130.
- Maroli, M., Cavallini, C., Khoury, C., Miceli, N., Manilla, G., 1991. Indagine entomologica sui flebotomi (Diptera, Psychodidae) in provincia di L'Aquila (Abruzzo). *Parassitologia* 33, 127–131.
- Maroli, M., Pontuale, G., Khoury, C., Frusteri, L., Raineri, V., 1997. About the eastern limit of distribution of *Phlebotomus ariasi* (Diptera, Psychodidae). *Parasite* 4, 377–381.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health* 13, 256–264.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F., 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 795–798.
- Martínez-Ortega, E., 1985. Los flebotomos ibéricos (Diptera: Psychodidae). I. Almería. *Ann. Biol.* 3, 107–111.
- Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.P., 2004. Isozymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4077–4082.
- Ready, P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro. Surveill.* 15, 19505.

- Rioux, J.A., Golvan, Y.J., Croset, H., Hoiun, R., Juminer, B., Bain, O., Tour, S., 1967. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 1. Les Phlébotomes (Echantillonnage – Ethologie). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 42, 561–603.
- Rioux, J.A., Golvan, Y.J., Croset, H., Tour, S., Houin, R., Abonnenc, E., Petitdidier, M., Vollhardt, Y., Dedet, J.P., Albaret, J.L., Lanotte, G., Quilici, M., 1969. Epidémiologie des Leishmanioses dans le Sud de la France. Monographie 37. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris.
- World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series no. 949. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf.

CAPÍTULO 3

First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study

PRIMER ESTUDIO SOBRE LA LEISHMANIOSIS CANINA EN UN ÁREA NO
TRADICIONAL DE LA ENFERMEDAD EN ESPAÑA (LLEIDA, CATALUNYA) BASADO EN
UN CUESTIONARIO VETERINARIO Y UN ESTUDIO SEROLÓGICO TRANSVERSAL

Cristina Ballart, Maria Magdalena Alcover, Albert Picado, Javier Nieto, Soledad Castillejo,
Montserrat Portús, Montserrat Gállego

PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE 2012

DOI: 10.1016/j.prevetmed.2012.09.003

RESUMEN

La distribución de la leishmaniosis canina en España es heterogénea y se dispone de pocos datos del norte del país, incluyendo la provincia de Lleida (Catalunya, España). Este trabajo describe los resultados obtenidos mediante un cuestionario enviado a los veterinarios de toda la provincia de Lleida. La mayoría de ellos (25/32, 78.1%) opinan que los casos de leishmaniosis canina han aumentado durante los últimos diez años y que los perros han sido infectados en la zona (30/32, 93.8%). Además, se ha llevado a cabo un estudio transversal de seroprevalencia en perros de perreras, con y sin signos compatibles con la enfermedad, en la comarca del Pallars Sobirà (Pirineo de Lleida), donde previamente se había detectado un caso autóctono de leishmaniosis canina. Para el análisis serológico se utilizaron cuatro tests (IFI, ELISA, Western blot, ICF) y los perros con resultados positivos para al menos dos de los métodos inmunológicos fueron considerados seropositivos y probablemente infectados. 33.1% (48/145) de los perros fueron seropositivos. Los resultados del modelo de regresión logística mostraron que el riesgo de seropositividad aumentaba con la edad (OR=1.35, p-valor=0.002), en los perros que habitaban en la parte sur del Pallars Sobirà (OR=6.20, p-valor=0.025), en aquellos cuyos dueños consideraban que sus animales estaban en riesgo de padecer la enfermedad (OR=1.26, p-valor=0.024) y en aquellos cuyos dueños no tenían conocimiento sobre la utilidad de métodos preventivos contra las picadas de flebotomos (OR=11.6, p-valor=0.009). El riesgo decrecía cuando los perros vivían en un hábitat urbano-periurbano (OR=0.17, p-valor=0.002). La información obtenida en el cuestionario veterinario nos ha ayudado a definir el conocimiento, la percepción y la sensibilización respecto a la enfermedad en una región donde era previamente desconocida, sosteniendo la hipótesis de la existencia de un foco de leishmaniosis canina en el Pallars Sobirà, confirmado posteriormente con el estudio seroepidemiológico llevado a cabo. El estudio de seroprevalencia realizado en perros de perreras de origen local ha resultado ser útil para la detección de un foco autóctono de leishmaniosis a través del análisis de un pequeño número de animales.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Preventive Veterinary Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prevetmed

First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study

Cristina Ballart^{a,b}, M Magdalena Alcover^{a,b}, Albert Picado^c, Javier Nieto^d, Soledad Castillejo^{a,b}, Montserrat Portús^a, Montserrat Gállego^{a,b,*}

^a Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Barcelona Center for International Health Research (CRESIB), Rosselló 132, 08036 Barcelona, Spain

^c Epidemiology and Disease Control Unit, Department of Public Health, Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, 2000 Antwerp, Belgium

^d Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, Majadahonda, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2012

Received in revised form 4 September 2012

Accepted 5 September 2012

Keywords:

Canine leishmaniasis
Questionnaire survey
Cross-sectional study
Serology
Pyrenees
Lleida
Spain

ABSTRACT

The Spanish distribution of canine leishmaniasis (CanL) is heterogeneous and very few data are available for the north of the country, including the province of Lleida (Catalonia, Spain). This work describes the results obtained from a questionnaire sent to veterinarians throughout the province of Lleida. The majority of veterinarians (25/32, 78.1%) believed CanL cases were increasing and that the dogs had been infected locally (30/32, 93.8%). Also, a cross-sectional study was performed on the seroprevalence of CanL in kennel dogs, with and without compatible clinical signs, in the county of Pallars Sobirà (Pyrenees of Lleida), where an autochthonous case of CanL had been previously detected. Four serological tests were used (IFAT, ELISA, Western blot, ICF) and dogs that tested positive with at least two immunological methods were considered seropositive and probably infected. 33.1% (48/145) of the dogs were seropositive. The results of a mixed logistic regression model showed that the risk of seropositivity increased with age (OR = 1.35, p -value = 0.002), among dogs living in the southern part of Pallars Sobirà (OR = 6.20, p -value = 0.025) and among dogs whose owners considered their animals to be at risk of leishmaniasis infection (OR = 1.26, p -value = 0.024) and who were unaware of anti-sand fly preventive methods (OR = 11.6, p -value = 0.009). The risk decreased when dogs lived in an urban-periurban habitat (OR = 0.17, p -value = 0.002). The information gathered in the veterinary questionnaires helped us to define the knowledge, perception and awareness of the disease in a naïve region, supporting the hypothesis of an existing CanL focus in Pallars Sobirà, which was confirmed by the seroepidemiological survey. The seroprevalence study carried out on kennel dogs of local origin proved useful for detecting an autochthonous focus of leishmaniasis through the analysis of a small number of animals.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024502; fax: +34 934024504.
E-mail address: mgallego@ub.edu (M. Gállego).

1. Introduction

Changes in global climate, human activities and migration have resulted in the emergence or re-emergence of vector-borne diseases in some parts of the world, including leishmaniasis, the only tropical vector-borne disease that

remains endemic throughout southern Europe (Dujardin et al., 2008).

Leishmaniasis in the Mediterranean region is due to *Leishmania infantum* and its transmission is mainly by the bite of permissive sand flies. Two proven vectors exist in the Iberian Peninsula, *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus* (Guilvard et al., 1996; Portús et al., 2007), both present in the province of Lleida (Gállego et al., 1990) where *L. infantum* DNA has been found in *P. ariasi* (Alcover et al., 2012).

The first cases of human and canine leishmaniasis in Spain were published in 1912 and 1913, respectively (Pittaluga, 1912, 1913). The human incidence of the disease decreased at the end of the 1940s, which is attributed to the use of insecticides in the agricultural and domestic environment as well as an antipaludic campaign (Gil Collado, 1977; Botet Fregola and Portús Vinyeta, 1993; Portús et al., 2007). There has been a re-emergence in recent years, mainly in immunosuppressed adults (Alvar et al., 1997). From 1982 until 1996 human leishmaniasis (HL) was considered a notifiable disease in Spain, but its notification is currently mandatory in only 12 of the country's 17 autonomous communities, including Catalonia. From 1982 to 2010, 879 HL cases were officially recorded in Catalonia, 37 of them in Lleida province (updated from Ballart et al., 2012a). Nevertheless, as individual cases are not always officially recorded, the real incidence is not well defined (Gállego, 2004; Portús et al., 2007; Dujardin et al., 2008).

The distribution of canine leishmaniasis (CanL) in Spain is heterogeneous, with the lowest seroprevalence in the North (1.6%) and the greatest in the South (34.6%) (Alvar Ezquerro, 2001; Morillas et al., 1996). Nevertheless, data on CanL distribution is incomplete, as declaration of the disease is not compulsory, with very few data available for the north of the country, including the province of Lleida (Catalonia, NE of Spain) where the first case of CanL has been recently reported (Ballart et al., 2012a).

CanL is considered an important disease by the World Organization for Animal Health (OIE) from the socio-economical and sanitary points of view. Dogs constitute the main reservoir hosts of the parasite, which represents a risk for humans (Gállego, 2004; Ready, 2010), particularly considering the high number of asymptomatic animals (Alvar et al., 2004; Dujardin et al., 2008; Molina et al., 1994).

The true extent of CanL in many parts of southern Europe is unknown, due to a lack of survey data, its incidence only being inferred indirectly (de Ybáñez et al., 2009). For this reason, a questionnaire was designed by the EDEN project (Emerging Diseases in a changing European eNvironment) to rapidly obtain information from veterinarians about the presence, diagnosis and perception of the disease. This questionnaire was applied in the province of Lleida as has been done in other parts of Europe by EDEN team participants (Morosetti et al., 2009; Farkas et al., 2011; Gálvez et al., 2011).

Described here are the results obtained from the EDEN questionnaire as well as a cross-sectional study on the seroprevalence of CanL in Pallars Sobirà (Pyrenees) where the aforementioned CanL case was detected, with particular focus on the possible factors responsible for the CanL emergence in the area. This is the first survey carried out on dogs

in the province of Lleida and was prompted by the possibility of the disease becoming wide-spread and established in the Pyrenees.

2. Materials and methods

2.1. Study area

A questionnaire-based survey on CanL was conducted among clinical veterinarians throughout the province of Lleida (Catalonia, NE of Spain). Lleida (41°36'N and 0°37'E; 12,173 km²) shares its northern border with Andorra and France and is territorially divided in 13 counties, occupying a great variety of habitats that range from just over sea level to over 3000 m above sea level (m a.s.l.) (Fig. 1). The climate varies from Mediterranean high-mountain in the mountainous areas of the north to continental in the central depression. With a population of 436,402 inhabitants in 2009 (approximately 35.8 inhabitants/km²) Lleida is the province with the lowest population density of Catalonia (IDESCAT Institut d'Estadística de Catalunya; <http://www.idescat.cat>). The only locality with more than 20,000 inhabitants is the capital, Lleida city, where 30% of the population lives.

Additionally, a cross-sectional serological study of CanL was carried out in Pallars Sobirà, a county of the province of Lleida located in the Spanish Pyrenees (42°25'N, 1°08'W), with a surface area of 1378 km². Its population density is very low (5.6 inhabitants/km² in 2009) and concentrated in small villages (IDESCAT Institut d'Estadística de Catalunya; <http://www.idescat.cat>). The altitude ranges from 600 to 3143 m a.s.l. and the climate is Mediterranean high-mountain, with cold winters and mild summers, except at over 1500 m a.s.l., where it could be considered alpine. The annual mean rainfall varies from 700 mm in the valleys to 1000 mm in the peaks, summer being the wettest season while winter is the driest. The orography of the region and its particular climate notably determine its vegetation, which is characterised by five different floors: basal with mixed oaks (from 600 to 1000 m a.s.l.), mountainous with oaks, beeches, firs and red pines (from 1000 to 1600 m a.s.l.), subalpine with black pine (from 1600 to 2200 m a.s.l.), alpine with pastures (from 2200 to 2800 m a.s.l.) and the mainly rocky snow floor (over 2800 m a.s.l.).

2.2. Veterinarian questionnaire on canine leishmaniasis

In 2009, a total of 41 questionnaires were sent to all the veterinarians with a pet veterinary clinic in the province of Lleida to survey their opinions on trends in CanL prevalence and control measures. The questionnaire was designed by members of the Leishmaniasis sub-project of the EDEN Project (http://www.eden-fp6project.net/emerging_diseases/leishmaniasis), and consisted of two pages of questions on different aspects of the disease in the area, including the approximate number of suspected and confirmed cases observed in the previous year, clinical signs and their frequency of appearance and utility in diagnosis, methods used to confirm CanL cases, etc. (Gálvez et al., 2011).

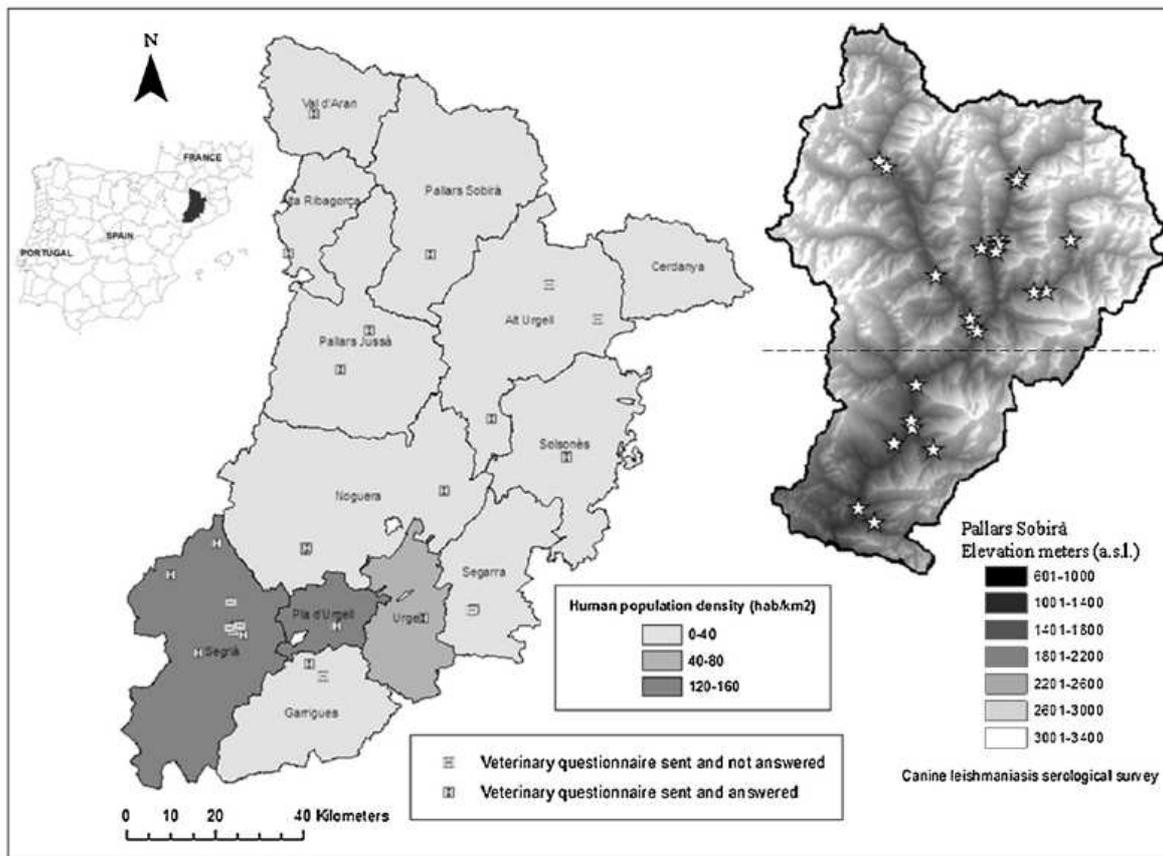


Fig. 1. Study area (Lleida province and Pallars Sobirà county), surveyed points for CanL and veterinarian questionnaires.

A conference was organized previously with the help of the *Col·legi Oficial de Veterinaris de Lleida* with the aim of involving the veterinarians in the study. Questionnaires were posted in a prepaid return envelope and also sent by e-mail. A second letter, following a telephone call, was sent when no answer to the questionnaire was received. The locations of veterinary clinics were geocoded using Google Earth (Fig. 1).

2.3. Serological study on canine leishmaniasis

2.3.1. Animals and samples

The cross-sectional study was performed in October 2009 in Lleida Pyrenees (Pallars Sobirà county). An active search for dog owners was necessary and was carried out with the help of the veterinarians of the area. The tested dogs belonged to 25 owners from 16 localities situated between 600 and 1300 m a.s.l. (Fig. 1). Blood samples of 145 dogs were obtained by cephalic vein puncture, with permission of the owners. Blood was collected in 5 ml tubes and on filter paper (Whatman 3). The tubes were centrifuged at room temperature and the serum was frozen and stored at -40°C until use. Filter papers were also stored at -40°C after air drying.

2.3.2. Data collection

Owner data and dog characteristics were collected in a PDA (Tungsten T5) using Pendragon Form v.5.0 software (PSC, Libertyville, IL, USA).

Clinical signs referable to canine leishmaniasis (Fig. 2) were also compiled during the clinical examination by local veterinarians, and dogs were classified as asymptomatic or symptomatic depending on the absence or presence of at least one of those clinical signs.

A GPS receiver (Tom Tom Wireless GPS MK II) was used to record geographical coordinates, and altitude data for each geocoded collection site was extracted from a 90 m resolution Digital Elevation Model (Jarvis et al., 2008) using ArcGIS 9.2 software (ESRI, Redlands, CA, USA).

2.3.3. Diagnostic techniques

Dog samples were analysed by four serological techniques: (1) an in-house immunofluorescent antibody test (IFAT), since this is considered the "gold standard" and reference test for CanL diagnosis (Alvar et al., 2004; OIE, 2008; WHO, 2010) and was chosen as the reference technique in the EDEN project; (2) an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), because it is habitually used by our team and has proved useful in epidemiological studies (Iniesta et al., 2002; Solano-Gallego et al., 2005; Fernández-Bellón et al., 2008); (3) an in-house Western Blot (WB) technique, because it is a more sensitive serological technique (Aisa et al., 1998; Iniesta et al., 2002), and (4) a commercial immunochromatographic test (ICF) for the detection of circulating anti-*Leishmania* kinesin antibodies, due to its rapidity and feasibility for use in the field.

The IFAT was performed according to standard procedures (Alvar et al., 2004). Sera from dogs were assayed in

DOG DEMOGRAPHIC DATA	VETERINARY DATA	DOG OWNER QUESTIONNAIRE
Name	Name and surname	Name and surname
Length of hair: Short <input type="checkbox"/> Medium <input type="checkbox"/> Long <input type="checkbox"/>	Address	Address
Colour of hair	Town	Longitude Latitude
Sex: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	Province	Town
If female, is pregnant?	Post code	Province
Date of birth	Telephone n°	Post code
Age (years)	e-mail	Telephone n°
Weight (kg)		e-mail:
Breed:	CLINICAL SIGNS REFERABLE TO CANINE LEISHMANIASIS	Have you heard of visceral leishmaniasis? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Country of origin		Form No.
Region of origin		What do you think is the risk that your dog will get leishmaniasis during its lifetime? 0% <input type="checkbox"/> 5% <input type="checkbox"/> 10% <input type="checkbox"/> 20% <input type="checkbox"/> 50% <input type="checkbox"/> 50-90% <input type="checkbox"/> 90-100% <input type="checkbox"/>
Province of origin	None <input type="checkbox"/>	Type of sample
DOG'S USUAL PLACE OF LIFE	Lymph node swelling <input type="checkbox"/>	Serum <input type="checkbox"/>
Address	Dematitis furfuracea <input type="checkbox"/>	Cutaneous sample <input type="checkbox"/>
Locality	Alopecia <input type="checkbox"/>	Peripheral blood <input type="checkbox"/>
Comarca Province	Ulcers <input type="checkbox"/>	Lymph node <input type="checkbox"/>
Long Lat	Onychogryphosis <input type="checkbox"/>	Bone marrow <input type="checkbox"/>
Resides in: In the home <input type="checkbox"/> In the open <input type="checkbox"/> In kennel <input type="checkbox"/>	Epistaxis <input type="checkbox"/>	DIAGNOSTIC TEST
Usual habitat: Urban <input type="checkbox"/> Periurban <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/>	Pale mucosa <input type="checkbox"/>	Microscopy <input type="checkbox"/>
Plain <input type="checkbox"/> Mountain <input type="checkbox"/>	Ocular lesions <input type="checkbox"/>	ELISA <input type="checkbox"/>
Nocturnal shelter/home: Outdoors <input type="checkbox"/> Indoors <input type="checkbox"/>	Splenomegaly <input type="checkbox"/>	IFAT <input type="checkbox"/>
Occupation of dog: Pet <input type="checkbox"/> Guard dog <input type="checkbox"/> Sheep dog <input type="checkbox"/> Hunting dog <input type="checkbox"/>	Weight loss <input type="checkbox"/>	WB <input type="checkbox"/>
Dog in kennel <input type="checkbox"/> Stray dog <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/> (specify):	Other <input type="checkbox"/> (specify)	In vitro culture <input type="checkbox"/>
Lives with other dogs: Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> If YES, How many:		PCR <input type="checkbox"/>
Lives with other animals Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Other <input type="checkbox"/> (specify)
If YES, which		Result
Movement/travel Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Positive <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/>
If YES, details of place		Titre
If YES, period		Observations
		Collar <input type="checkbox"/>
		Scalbor <input type="checkbox"/>
		Other collar (specify) <input type="checkbox"/>
		Details collar: <input type="checkbox"/>
		Spot-on <input type="checkbox"/>
		Advantix <input type="checkbox"/> Expot <input type="checkbox"/> Other <input type="checkbox"/>
		Details
		Spray <input type="checkbox"/>
		Duowin <input type="checkbox"/>
		Other (specify) <input type="checkbox"/>
		Details spray: <input type="checkbox"/>
		Shampoo <input type="checkbox"/>
		Other (specify) <input type="checkbox"/>
		Details:
		If NO, why not? Can't find them in the shop <input type="checkbox"/>
		Too expensive <input type="checkbox"/>
		Don't think they work <input type="checkbox"/>
		VL risk not important <input type="checkbox"/>
		Other (specify) <input type="checkbox"/>
		Do you apply any insecticide on your dog to protect it from other insect or tick bites? Yes <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
		If YES, provide details

Fig. 2. Questionnaire filled in by dog owners and veterinarians in the county of Pallars Sobirà.

serial two-fold dilutions from 1:40 to 1:1280, and antibody fixation was revealed with 1:100 FITC-conjugated rabbit anti-dog IgG (H+L) (ICN Plaza, Costa Mesa, California) in 0.01% Evans blue. The cut-off for positive sera was 1:80, in accordance with other authors (OIE, 2000; Alvar Ezquerro, 2001; Dereure et al., 2009; Gálvez et al., 2010).

The ELISA and WB tests were performed according to Riera et al. (1999). For the ELISA test, sonicated promastigotes coated to the plate were used as antigens. The sera were used at a dilution of 1:400 and Protein A peroxidase (Sigma) (1:30,000) was used instead of the second antibody. The reaction was stopped with H₂SO₄ 3 M and the optical densities were measured at 492 nm using a Titertek Multiskan PlusMKII (Flow Laboratories International, SA, Lugano, Switzerland). The reaction was quantified in units (U) by reference to a positive control serum arbitrarily set at 100 U. The cut-off was established at 24 U (Riera et al., 1999).

For the WB, separation of different fractions in *L. infantum* antigen was performed with 0.1% SDS-12% polyacrylamide gel electrophoresis on a Mini-gel AE 6400 Dual Mini Slab Kit (Atto, Bunkyo-Ku, Japan) and transblotted onto nitrocellulose sheets (0.45 µm pore size, HAWP 304 FO; Millipore, Bedford, MA). Fractions were recognized by sera diluted to 1:50 and Protein A peroxidase (1:1000) was used instead of the second antibody. The reaction was considered positive when any of the polypeptide fractions considered most useful were revealed (14, 16, 18 or 24 kD) (Aisa et al., 1998; Iniesta et al., 2007).

The immunochromatographic dipstick test (Speed[®] Leish K, BVT Group, Virbac) was carried out on the serum following the manufacturer's instructions.

To avoid problems of nonspecificity of the techniques used, mainly present when results were near the cut-off, dogs that tested positive with at least two immunological methods were considered seropositive and probably infected (Iniesta et al., 2002).

2.3.4. Statistical analysis

A mixed logistic regression model was used to assess the relationship between seropositivity in dogs (outcome) and a series of individual and location variables (covariates). The villages where the dogs live were used as random effects to take into account the clustering of the data (Alonso et al., 2010), and maximum likelihood estimation was applied. The covariates considered in the analysis were: location of the village in Pallars Sobirà (North/South), altitude (600–800/801–1000/>1000 m), habitat (urban-periurban/rural), place of abode (outdoors/inside/in kennel), use given (pet dog/hunting dog/others), sleeping habits (outdoors/indoors), age in years (<1/1/2/3/4/5/6/>6), hair length (short/medium-long), sex (female/male), breed size in kg (≤25/>25), breed (pedigree dog/crossed dog), lives with other dogs (yes/no), lives with other animals (yes/no) and clinical signs (asymptomatic/symptomatic). Similarly, information on knowledge, attitude and practice was gathered from the owners: had they heard of leishmaniasis (yes/no), the risk of dogs having

leishmaniasis (0%/5%/10%/20%/50%/50–90%/90–100%), did they use prevention methods (yes/no), if YES, what methods were known (collar/not proceed), if NO, why not (I don't think it works/leishmaniasis is not important/other/not proceed) and did they use topical insecticides (yes/no). The defined categories were based on those used in previous publications (Martín-Sánchez et al., 2009; Gálvez et al., 2010) and the characteristics of the data in the present study. Age and "perceived risk of dogs having leishmaniasis" were used as continuous variables in the model.

A two-step approach was used to determine the most parsimonious multivariate model. First, the association of all covariates and the outcome were assessed one by one

in a bivariate analysis. Covariates with a p -value ≤ 0.2 were further tested in a multivariate mixed model (Gálvez et al., 2010). In this second step, a backward stepwise selection method was used to select the final model using a p -value of ≤ 0.05 as the threshold for removal.

All statistical analyses were performed using Stata 12 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

3. Results

3.1. Veterinary questionnaire survey

Thirty two of the 41 (78%) questionnaires sent to the veterinarians specialized in small animals were returned.

Table 1
Results obtained from the veterinary questionnaire surveying the entire province of Lleida.

Type of dogs population	N	(%)	Diagnostic methods	N	(%)
Clients			Epidemiology		
Mixed	23	(71.9)	No	30	(93.8)
Rural	7	(21.9)	Yes	2	(6.3)
Urban	2	(6.3)	Clinical signs only		
Dogs examined/week			No	32	(100)
4–10	3	(9.4)	Serology-IFAT		
11–20	11	(34.4)	No	17	(53.1)
>20	18	(56.3)	Yes	15	(46.9)
Dogs suspected (last 12 months)			Serology-ELISA		
1–5	5	(15.6)	No	20	(62.5)
6–10	8	(25)	Yes	12	(37.5)
11–20	6	(18.8)	Serology-rapid detection Kit (ICF)		
21–50	10	(31.3)	No	8	(25)
>50	3	(9.4)	Yes	24	(75)
CanL confirmed cases (last 12 months)			Microscopy-Lymph node puncture		
1–5	10	(31.3)	No	30	(93.8)
6–10	8	(25)	Yes	2	(6.3)
11–20	8	(25)	Microscopy-Bone marrow puncture		
21–50	3	(9.4)	No	26	(81.3)
>50	3	(9.4)	Yes	6	(18.8)
New cases of CanL			Microscopy-Cutaneous biopsy		
1–5	14	(43.8)	No	31	(96.9)
6–10	7	(21.9)	Yes	1	(3.1)
11–20	8	(25)	PCR		
21–50	1	(3.1)	No	29	(90.6)
>50	2	(6.3)	Yes	3	(9.4)
Dogs infected in the area			Place where diagnosis was confirmed		
No	2	(6.3)	Own laboratory		
Yes	30	(93.8)	No	11	(34.4)
Evolution (past 10 years)			Yes	21	(65.6)
Decrease	4	(12.5)	Private laboratory		
Increase	25	(78.1)	No	7	(21.9)
No evolution	3	(9.4)	Yes	25	(78.1)
Preventive measures recommended			Departmental veterinary laboratory		
Collar			No	27	(84.4)
No	0	(0)	Yes	5	(15.6)
Yes	32	(100)			
Spot-on					
No	13	(40.6)			
Yes	19	(59.4)			
Spray					
No	28	(87.5)			
Yes	4	(12.5)			
Shampoo					
No	32	(100)			
Yes	0	(0)			
Preventive products specifically against sand flies					
No	5	(15.6)			
Yes	27	(84.4)			

Abbreviations: N, number of answers; (%), percentage of answers.

We received at least one questionnaire from each county, the numbers varying from 1 to 13, with the exception of La Cerdanya, where no veterinary clinic existed at the time of study (Fig. 1).

71.9% of veterinarians had clients from mixed environments (urban and rural) and over half the clinics received more than 20 dogs per week (56.3%) (Table 1). Approximately 40% had received more than 20 suspected cases of leishmaniasis in the last 12 months (40.6%). The range of confirmed and new cases is shown in Table 1. A large percentage of the veterinarians (93.8%) thought that dogs had been infected in the study area and 78.1% reported an increase in the disease in the last 10 years. All the veterinarians recommended preventive measures, specifically impregnated collars (100%). Most of the practitioners also recommended the use of preventive agents that specifically indicate repellent effects against phlebotomine sand flies (84.4%).

All the veterinarians used different methods to confirm clinical suspicion. Serology was applied in all cases, using any of three techniques (ICF, IFAT and ELISA). Other methods used were microscopic analysis (18.8%) or PCR (9.4%). Diagnosis was practiced in external private laboratories (78.1%) as well as in the veterinarians' own laboratories (65.6%).

The frequency and diagnostic value of the clinical signs described by the veterinarians are included in Table 2. Other signs, such as chronic diarrhoea (1 case) and arthritis (1 case), were considered.

3.2. Descriptive analysis of cross-sectional canine leishmaniasis survey

3.2.1. Defining the dog population and owner awareness of leishmaniasis

A total of 145 dogs were examined from 16 villages in the county of Pallars Sobirà in 2009 (Fig. 1). All dogs were autochthonous except 2 from France, 1 from central Spain and 3 from Andorra. The characteristics of the dog population are recorded in Table 4. Dogs were distributed at different altitudes, ranging from 601 to 1300 m a.s.l. The majority of the dogs came from rural areas (57.2%), lived in kennels (80.7%), slept outdoors (91.7%) and were hunting dogs (84.1%). The number of females (45.5%) and

Table 3

Serological results (% of positives) on CanL obtained from 145 dogs from Pallars Sobirà County (Lleida, NE Spain).

IFAT (%)	ELISA (%)	WB (%)	ICF (%)	Seropositive dogs (%) ^a
20	29.7	37.9	22.1	33.1

^a Dogs were considered seropositive when they tested positive in at least two immunological methods.

males (54.5%) was similar, as was the number of pure breed (57.9%) or crossbreed dogs (42.1%). Most of the dogs were ≤ 25 kg (71%). The majority lived with other dogs (95.2%) and only some of them lived with other animals (20%).

The answers of the owners to questions on leishmaniasis awareness revealed that most of them had heard of visceral leishmaniasis (85.5%) and more than half (59.3%) considered their dogs were not at risk of contracting leishmaniasis during their lifetime. Approximately half of them had knowledge of preventive measures against sand fly bites (50.3%). All the owners with awareness of preventive methods against CanL used collars on their dogs (42.1% of the totality).

3.2.2. Serological results

Based on the results obtained with the different serological techniques (Table 3), 48 (33.1%) dogs were considered probably infected and positive for the statistical analysis. Positive dogs were found at all altitudinal ranges (from 600 to 1300 m a.s.l.) in 12 of the 16 localities studied (75%) and all of them had been born in the area (Table 4). The prevalence ranged from 0% to 66% but the infection was not concentrated in any particular village.

Clinical examination of dogs revealed that 31.2% of seropositive animals had signs referable to CanL (Fig. 2). One or more of those clinical signs were observed in symptomatic dogs, which included weight loss, alopecia, dermatitis furfuracea, ocular lesions, onychogryphosis and lymph node swelling.

3.3. Bivariate analysis

The relationship between dog seropositivity and a series of individual and location variables are presented in Table 4. Significant differences in CanL risk ($p < 0.05$) were found

Table 2

Clinical signs reported in the veterinary questionnaire on CanL.

Clinical sign	Frequency (%)				Diagnostic value (%)			
	Very frequent	Frequent	Rare	No answer	High	Medium	Low	No answer
Loss of weight	46.9	53.1	0	0	56.3	21.9	12.5	9.4
Tiredness	9.4	68.8	21.9	0	15.6	21.9	50	12.5
Anaemia	21.9	43.8	34.4	0	12.5	31.3	46.9	9.4
Hyperthermia	0	25	71.9	3.1	9.4	15.6	65.6	9.4
Epistaxis	9.4	40.6	50	0	43.8	25	18.8	12.5
Alopecia	37.5	46.9	15.6	0	21.9	37.5	31.3	9.4
Squamosis	53.1	43.8	3.1	0	31.3	34.4	25	9.4
Onychogryphosis	28.1	40.6	28.1	3.1	34.4	34.4	18.8	12.5
Ulcers	21.9	53.1	25	0	18.8	43.8	28.1	9.4
Adenopathy	59.4	34.4	6.3	0	50	21.9	18.8	9.4
Ocular lesions	6.3	40.6	53.1	0	12.5	31.3	46.9	9.4
Renal failure	9.4	56.3	31.3	3.1	9.4	53.1	25	12.5
Splenomegaly	3.1	18.8	71.9	6.3	6.3	21.9	56.3	15.6

Table 4

Main characteristics of the Pallars Sobirà dog population and owner awareness of leishmaniasis. Serological results obtained and bivariate factors associated with canine leishmaniasis (two positive serological tests).

Pallars Sobirà county (145 dogs)	N. dogs analyzed	% of seropositive dogs	Bivariate	
			OR (95% CI)	p-Value
Village location ^a				
North Pallars Sobirà (817–1219 m a.s.l., mean: 1004 m a.s.l.)	63	22	Ref	
South Pallars Sobirà (619–1169 m a.s.l., mean: 792 m a.s.l.)	82	40	2.15(1.04–4.47)	0.039
Altitude (m)				
600–800	49	41	Ref	
801–1000	38	29	0.59(0.24–1.46)	0.253
>1000	58	29	0.60(0.27–1.34)	0.214
Habitat ^a				
Rural	83	41	Ref	
Urban-Periurban	62	22.6	0.42(0.20–0.88)	0.021
Abode				
Outdoors	16	25	Ref	
In the home	12	8.3	0.27(0.03–2.83)	0.276
In kennel	117	36.8	1.74(0.53–5.74)	0.361
Sleeping habits ^a				
Outdoors	133	35.3	Ref	
Indoors	12	8.3	0.17(0.02–1.33)	0.091
Use given				
Pet dog	11	27.3	Ref	
Hunting dog	122	36.1	1.50(0.38–5.96)	0.561
Others	12	12.5	0.24(0.02–2.78)	0.255
Age (in years) ^a			1.34(1.11–1.61)	0.002
<1	7	0		
1	23	8.7		
2	19	21.1		
3	24	45.8		
4	14	35.7		
5	18	38.9		
6	9	44.4		
>6	31	48.4		
Hair length				
Short	83	34.9	Ref	
Medium-long	62	75	0.82(0.41–1.66)	0.587
Sex ^a				
Male	79	38	Ref	
Female	66	27.3	0.61(0.30–1.24)	0.174
Breed size (kg)				
≤25	103	67	Ref	
>25	42	67	1.01(0.47–2.17)	0.970
Breed				
Pedigree dog	84	31	Ref	
Crossed dog	61	36.1	1.26(0.63–2.53)	0.519
Lives with other dogs				
Yes	138	34.1	Ref	
No	7	14.3	0.32(0.04–2.76)	0.302
Lives with other animals				
Yes	29	27.6	Ref	
No	116	34.5	1.38(0.56–3.40)	0.481
Symptomatology ^a				
Asymptomatic	113	29.2	Ref	
Symptomatic	32	46.9	2.14(0.96–4.78)	0.064
The owner has heard of VL ^a				
Yes	124	35.5	Ref	
No	21	19	0.43(0.13–1.35)	0.148
Risk of dogs having leishmaniasis according to the owner ^a			1.24(1.05–1.47)	0.013
0%	86	27.9		
5%	14	28.6		
10%	4	50		
20%	20	30		
50%	1	0		
50–90%	9	44.4		
90–100%	11	72.7		
The owner has knowledge of preventive measures against sand flies bites ^a				
Yes	73	38.4	Ref	
No	72	27.8	0.62(0.31–1.24)	0.177

Table 4 (Continued)

The owner has used prevention methods against VL (If YES, collars) ^a				
Yes	61	39.3	Ref	
No	84	28.6	0.62(0.31–1.24)	0.175
If NO, why?				
It doesn't work	4	25	Ref	
VL is not important	29	37.9	1.83(0.17–19.89)	0.618
Other	51	23.5	0.92(0.09–9.71)	0.947
Not proceed	61	39.3	–	–
The owner has used topical insecticides against arthropod bites				
Yes	124	33.9	Ref	
No	21	28.6	0.78(0.28–2.16)	0.634

^a Variable used as continuous in the model.

^{*} Variable included in the multivariate model ($p < 0.2$).

Table 5

Estimates of the mixed logistic regression model determining the risk factors for dogs being seropositive. Risks expressed as Odds Ratios (OR) and their 95% Confidence Intervals (95% CI). Location of dogs was set up as a random effect in the mixed model.

Variable	OR	95% CI	p-Value
Age	1.35	1.12–1.64	0.002
Urban-Periurban	0.17	0.06–0.52	0.002
South Pallars Sobirà	6.20	1.25–30.69	0.025
Probability of CanL according to the owner	1.26	1.03–1.54	0.024
Owner is unaware of anti-sand fly methods	11.6	1.83–73.86	0.009

for the variables of village location ($p=0.039$), habitat ($p=0.021$), age ($p=0.002$), and risk of dogs contracting leishmaniasis according to their owners ($p=0.013$).

3.4. Multivariate analysis

The results of the final multivariate mixed model are summarised in Table 5. The risk of dogs being seropositive increased with age (OR = 1.35, p -value = 0.002) (Table 5), among dogs living in the southern part of Pallars Sobirà (OR = 6.20, p -value = 0.025), and among those whose owners considered their animals to be at risk of leishmaniasis infection (OR = 1.26, p -value = 0.024) and who were unaware of anti-sand fly preventive methods (OR = 11.6, p -value = 0.009). The risk decreased when dogs lived in an urban-periurban habitat compared to rural areas (OR = 0.17, p -value = 0.002).

4. Discussion

4.1. Veterinarian questionnaire on canine leishmaniasis

The number of questionnaires sent to the practitioners corresponded to the number of veterinary pet clinics in the province of Lleida in 2009. The clinics are distributed among all the counties, with the exception of La Cerdanya, where no veterinary clinic existed when the study was performed. Lleida is mainly an agricultural and farming region with a low human population density and where the veterinarians work principally with farm animals. Despite the small number of questionnaires sent out, as explained above (41), the response (78%) was considerably greater than in other European studies using this methodology (23%, 31% and 47%) (de Ybáñez et al., 2009; Farkas et al.,

2011; Gálvez et al., 2011) and similar to a study carried out in Italy (83.3%) (Morosetti et al., 2009), the percentage of response being independent of veterinary opinion on CanL trends. The high percentage of returned questionnaires could be related with the extent of veterinarian awareness of the disease and the widespread opinion that CanL has increased among patients during the last ten years (78.1%) or, as in the Italian study, that cases would increase in the future.

In our study, the dogs attending the veterinarian clinics were mainly from mixed areas (71.9%), reflecting that Lleida is a region composed of towns and villages with agricultural and farming activities. A high percentage of the veterinarians thought that CanL cases were new and acquired locally, which plays in favour of an active focus in the region.

The clinical diagnosis of CanL is hampered by the wide spectrum of clinical signs, including cutaneous or systemic signs, and asymptomatic or atypical forms (Gradoni, 2002; Gállego, 2004; Alvar et al., 2004; Baneth et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009). In agreement with other authors (Gálvez et al., 2011), the most frequent clinical signs observed by the veterinarians in the present study were adenopathies, squamosis, loss of weight and alopecia, the highest diagnostic value being given to loss of weight and adenopathies (56.3% and 50%, respectively). Clinical signs described as uncommon were hyperthermia, splenomegaly and ocular lesions, and these were considered of low diagnostic value, along with renal failure.

Possibly due to the difficulty in clinical diagnosis, all veterinarians used analytical methods to confirm CanL cases. Serology was the diagnostic method of choice to confirm a suspicious case (100%) and results were corroborated in the veterinarian's own laboratory (65.6%) as well as in external private laboratories (78.1%).

All the practitioners recommended actively preventive measures, particularly collars and spot-on products, as in other European regions (de Ybáñez et al., 2009; Morosetti et al., 2009; Gálvez et al., 2011). This could be related with the general veterinary opinion that local CanL cases had increased (78.1%) and that the infections were acquired in the area (93.8%), leading them to consider the disease as a real epidemiological problem.

The information gathered in the veterinary questionnaires, which proved to be a simple, cheap and feasible method for collecting data, helped us to rapidly define the knowledge, perception and awareness of the disease in the

naïve region, as has previously been done in other parts of Europe. The questionnaire results support the hypothesis of an existing CanL focus in Pallars Sobirà put forward by Ballart et al. (2012a).

4.2. Cross sectional study of canine leishmaniasis

For a long time, seroepidemiological studies on CanL in Spain were able to take advantage of rabies vaccination campaigns to collect blood. Nowadays, the rabies vaccination is no longer mandatory in some regions, including our area of study, making it necessary to rely on the help of local veterinarians to search for dogs and encourage owner participation. The long tradition of hunting among the inhabitants of Pallars Sobirà explains why a high percentage of dogs in the study were hunting dogs living in kennels in a rural environment (54%). Dogs of this kind of population have been considered as sentinel indicators of diseases of veterinary and zoonotic interest (Cabezón et al., 2010).

The most useful diagnostic approaches to the study of infected dogs include serological and molecular techniques (Solano-Gallego et al., 2009). Many serological methods have been used to diagnose CanL, showing different degree of sensitivity and specificity that could influence in the seropositivity of CanL in an area as it shown in this study (Table 3) (Aisa et al., 1998; Iniesta et al., 2002; Riera et al., 1999). For this reason we decided to combine several techniques and considered as seropositive dogs that tested positive with at least two immunological methods according to Iniesta et al. (2002). Studies applying IFAT have used different cut-offs: 1:40 in areas considered non endemic (Morosetti et al., 2009; Baldelli et al., 2011), and 1:80 or 1:160 in endemic areas (Dereure et al., 2009; Martín-Sánchez et al., 2009; Gálvez et al., 2010; Morales-Yuste et al., 2012). We decided to use the intermediate cut-off (1:80) for the naïve area studied, which is also the most frequently used in Europe (Franco et al., 2011). All the dogs with IFAT values of 1:80 produced at least two other positive serological tests (data not shown), confirming the utility of the cut-off considered in the present study.

The seroprevalence reported in this study (33.1%), in an area where the presence of the disease was unknown, is high considering that the highest seroprevalence value found in a known focus in Spain is 34.6% (Morillas et al., 1996). However, our figure can be considered as an over-estimation due to the biased nature of the sample. The analyzed dogs (57.2% from rural and 37.2% from peri-urban environments and 80.7% in kennels) lived outdoors in optimal conditions for disease transmission (Fisa et al., 1999; Amusatogui et al., 2004; Martín-Sánchez et al., 2009; Gálvez et al., 2010; Morales-Yuste et al., 2011), due to the predominant exophilic and exophagic character of most sand fly species taking a blood meal at twilight or night (Killick-Kendrick, 1999).

The density of dogs living in kennels is another factor that facilitates parasite transmission both directly and by vector, as previously mentioned and reviewed (Riera and Valladares, 1996; Solano-Gallego et al., 2009).

The risk of seropositivity in dogs increased with age, contrary to the results reported by Morales-Yuste et al. (2011). Even if the seroprevalence may vary in different

age groups and may decrease in older dogs (Fisa et al., 1999; Alonso et al., 2010) the risk of seropositivity tends to increase with age (Gálvez et al., 2010). All the analyzed dogs of <1 year included in the study had spent the summer period in the area and therefore could have been infected by a sand fly bite. With age, the risk of exposure to sand fly bites increases (Abranches et al., 1991) due to more transmission periods spent in endemic areas. The chronic evolution of CanL also favours the possibility of sand flies becoming infected in endemic areas.

Similarly to other studies (Martínez-Cruz et al., 1990; Acedo Sánchez et al., 1996; Alonso et al., 2010; Gálvez et al., 2010; Morales-Yuste et al., 2011), no significant differences were found regarding altitude (Table 4). Nevertheless, the multivariate analysis showed an increasing or decreasing risk for CanL depending on whether the dog location was southern or northern, respectively (Table 5). The odds of leishmaniasis infection increased 6.20 times in dogs living in southern Pallars Sobirà. Differences in prevalence could be related to the qualitative and quantitative composition of the vectors. The two vector species of *L. infantum* in Spain, *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus*, are present in the area, but their relative abundance differs between the north and south (authors' unpublished data). *P. ariasi* prefers humid and sub-humid environments whilst *P. perniciosus* is favoured by periarid or subhumid conditions (Gállego et al., 1990). Also, differences in temperature between both areas could play a role in the activity period and phenological behaviour of the vectors, which may affect their vectorial ability. It has been observed that the risk period in a transmission season varies according to the age structure of the gonotrophically concordant sand fly population and is independent of the maximal population density. In addition, the impact of temperature on the life cycle of leishmania in the vector has been demonstrated experimentally (Rioux et al., 1985).

No differences were found related to the sleeping habits of the dogs (outdoors/indoors), in contrast with results reported by other authors (Zaffaroni et al., 1999; Gálvez et al., 2010; Morales-Yuste et al., 2011). Location of dogs in a rural environment increases CanL risk, as shown by the multivariate analysis. This factor has also been mentioned as influential by other authors (Acedo Sánchez et al., 1996; Biglino et al., 2010).

The proportion of asymptomatic dogs was statistically similar to that of symptomatic animals, as in numerous other studies (Acedo Sánchez et al., 1996; Fisa et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2001; Gálvez et al., 2010; Cabezón et al., 2010). As mentioned earlier, one or more clinical signs compatible with CanL were observed in symptomatic dogs. Some of these signs (alopecia, adenopathies and squamosis) were also mentioned in the veterinarian questionnaire as those most frequently observed.

Two variables related with the owners were found to be risk factors for dog infection (Table 5): owner opinion about the risk of their dogs contracting CanL during their lifetime (OR: 1.26) and owner unawareness of prophylactic measures against CanL that protect dogs from sand fly bites (OR: 11.6) (Table 5). In the first variable, ownership of an ill dog could heighten the perceived risk of infection for the animals in the area. In the second variable,

owner unawareness of preventive measures implies a high possibility of their dogs experiencing sand fly bites and consequently being infected. In rural areas most dog owners did not routinely visit a veterinarian, especially if their animals were not ill, and so were not exposed to recommendations for using the preventive measures mentioned by veterinarians in the questionnaire. Nevertheless, we found that 42.1% of the analyzed dogs used a preventive method, a collar, which is effective against sand fly bites (Molina et al., 2001).

The utility of sampling kennel dogs in studies on CanL has been discussed (Cabezón et al., 2010; Baldelli et al., 2011; Miró et al., 2012), referring mainly to kennels that collect free-roaming and abandoned dogs with no data on their origin. In our case, the kennels had private owners and the majority of the dogs were local and had identification cards. Thus, our study of kennel dogs of local origin proved useful for detecting an autochthonous focus of leishmaniasis through the analysis of a small number of animals (145 dogs). Nevertheless, it should be taken into account that this is a biased canine population and so the results obtained do not reflect the real prevalence of CanL in the area. Consequently, serological studies of a more representative population of dogs are necessary to obtain more accurate data.

4.3. Presence of a stable focus of canine leishmaniasis in Lleida province (Spain)

The idea that CanL has increased in Spain in the last decades is widespread among veterinarians as well as dog owners. Nevertheless, whether this perceived rise in CanL is real or is due to a greater awareness and improved diagnosis remains an open debate. The spread of CanL in some parts of Europe has been demonstrated in recent years (Maroli et al., 2008; Dereure et al., 2009; Miró et al., 2012). Data on CanL in Lleida province are very scarce and recent (Ballart et al., 2012a), and only 37 cases of HL were declared between 1986 and 2010 (updated from Ballart et al., 2012a), which could have been locally acquired or imported from other endemic areas. In Mediterranean *L. infantum* foci, dogs are considered the main reservoir for HL. An Iranian study showed that dog ownership is a major risk factor for *L. infantum* infection in humans (Gavvani et al., 2002).

Although no comparative data are available, environmental changes leading to an increase and new distribution of sand fly vectors have been proposed as responsible for the spread and/or increase of the disease (Desjeux, 2001; Ferroglio et al., 2005; Ready, 2008; Morosetti et al., 2009; Colwell et al., 2011; Ballart et al., 2012b). Furthermore, only one fragmentary study on sandflies in Lleida province has been reported (Gállego et al., 1990), so it is not possible to estimate if the distribution and density of the vector has changed in recent years.

The high percentage of seropositive asymptomatic dogs detected in the current study prompts us to hypothesize that the existence of CanL in Pallars Sobirà county is not very recent, which is supported by a seroprevalence threshold usually associated with steadily established CanL foci (2.5%) (Rioux et al., 1971). Also, a high percentage of

asymptomatic cases among seropositive dogs is frequently found in endemic areas (Fisa et al., 1999; Gálvez et al., 2010), which would also support the idea that CanL is not new in the studied area. Thus, although there is no conclusive data about whether the disease is increasing or is now being diagnosed more efficiently, the present study shows the existence of a CanL focus in the Lleida province, particularly in the Pyrenean area. The observed seroprevalence of CanL complies with the criteria established by Maroli et al. (2008) to define an undisputable leishmaniasis focus: (i) the confirmation of one or more CanL cases, mostly by serological methods and in one case isolation of the parasite (Ballart et al., 2012a); (ii) seropositive dogs found amongst the asymptomatic residents, and (iii) two vector species present in the area of study (Gállego et al., 1990). In addition, *L. infantum* DNA has been found in sand flies of the region (Alcover et al., 2012). The partial data provided by our study using standardized methods (EDEN), could be the basis of future research to determine the extension and dynamics of the focus.

5. Conclusion

The response to the opinion poll carried out among veterinary practitioners in the province of Lleida (Spain) suggested the presence of an autochthonous focus of canine leishmaniasis in this region, which was confirmed by a cross-sectional serological study in Pallars Sobirà. Further serological studies on a more representative dog population are required to know the true extent and prevalence of the infection.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

Ethics

Not required.

Acknowledgements

The authors would like to thank the owners of the dogs for allowing us to collect the samples, the veterinarian Josep Maria de Moner for his active participation in the field work and Silvia Tebar for providing technical help. We also thank the *Col.legi de Veterinaris* of Lleida as well as the veterinarians who completed the questionnaires.

This work was supported by grants of the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (AGL2004-06909-C02-01; CG12010-22368-C02-01), Department d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Spain) (2009SGR385) and European Union (GOCE- 2003-010284 EDEN, Emerging Diseases in a changing European Environment). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. C. Ballart was awarded a PhD student grant of the EDEN project.

Thanks are also due to the reviewers for their helpful comments.

References

- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D., Conceição-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77, 557–561.
- Acedo Sánchez, C., Martín Sánchez, J., Vélez Bernal, I.D., Sanchís Marín, M.C., Louassini, M., Maldonado, J.A., Morillas Márquez, F., 1996. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 26, 303–310.
- Aisa, M.J., Castillejo, S., Gállego, M., Fisa, R., Riera, M.C., de Colmenares, M., Torras, S., Roura, X., Sentis, J., Portús, M., 1998. Diagnostic potential of Western Blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 154–159.
- Alcover, M.M., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ballart, C., Castillejo, S., Picado, A., Bongiorno, G., Portús, M., Gállego, M., 2012. Application of a nested-PCR in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors (*Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus*) in Catalonia (NE of Spain). *Parasitol. Res.* 111, 515–523.
- Alonso, F., Giménez Font, P., Manchón, M., Ruiz de Ybáñez, R., Segovia, M., Berriatua, E., 2010. Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean area. *Zoonoses Public Health* 57, 318–328.
- Alvar Ezquerro, J.P., 2001. Las leishmaniasis: de la biología al control. *Laboratorios Intervet, Salamanca*, p. 200.
- Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R., Moreno, J., 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 298–319.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Amusatégui, I., Sainz, A., Aguirre, E., Tesouro, M.A., 2004. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in Northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 154–157.
- Baldelli, R., Piva, S., Salvatore, D., Parigi, M., Melloni, O., Tamba, M., Bellini, R., Poglayen, G., 2011. Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. *Vet. Parasitol.* 179, 57–61.
- Ballart, C., Alcover, M.M., Portús, M., Gállego, M., 2012a. Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 134–136.
- Ballart, C., Barón, S., Alcover, M.M., Portús, M., Gállego, M., 2012b. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: first finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta Trop.* 122, 155–159.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, 324–330.
- Biglino, A., Bolla, C., Concialdi, E., Triscioglio, A., Romano, A., Ferroglio, E., 2010. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont Region) where such infections are traditionally nonendemic. *J. Clin. Microbiol.* 48, 131–136.
- Botet Fregola, J., Portús Vinyeta, M., 1993. La leishmaniasis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912–1985). *Rev. San. Hig. Púb.* 67, 225–266.
- Cabezón, O., Millán, J., Gomis, M., Dubey, J.P., Ferroglio, E., Almería, S., 2010. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. *Parasitol. Res.* 107, 1505–1508.
- Colwell, D.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2011. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet. Parasitol.* 182, 14–21.
- de Ybáñez, R., del Río, L., Martínez-Carrasco, C., Segovia, M., Cox, J., Davies, C., Berriatua, E., 2009. Questionnaire survey on canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 164, 124–133.
- Desjeux, P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 239–243.
- Dereure, J., Vanwambeke, S.O., Malé, P., Martínez, S., Pratlong, F., Balard, Y., Dedet, J.P., 2009. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector-borne Zoonotic Dis.* 9, 687–694.
- Dujardin, J.C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y., Boelaert, M., 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1013–1018.
- Farkas, R., Táncoz, B., Bongiorno, G., Maroli, M., Dereure, J., Ready, P.D., 2011. First Surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 823–834.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Ferrer, L., Gállego, M., Alberola, J., Ramis, A., 2008. Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 32–36.
- Ferroglio, E., Maroli, M., Gastaldo, S., Mignone, W., Rossi, L., 2005. Canine leishmaniasis, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1618–1620.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, M., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- Franco, A.O., Davies, C.R., Mylne, A., Dedet, J.P., Gállego, M., Ballart, C., Gramiccia, M., Gradoni, L., Molina, R., Gálvez, R., Morillas-Márquez, F., Barón-López, S., Alves Pires, C., Afonso, M.O., Ready, P.D., Cox, J., 2011. Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology* 138, 1878–1891.
- Gállego, M., Rioux, J.A., Rispaill, P., Guilvard, E., Gállego, J., Portús, M., Delalbre, A., Bastien, P., Martínez-Ortega, E., Fisa, R., 1990. Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Rev. Ibér. Parasitol.* 50, 123–127.
- Gállego, M., 2004. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 23, 661–676.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E., Molina, R., 2010. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet. Parasitol.* 169, 327–334.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Molina, R., 2011. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Prev. Vet. Med.* 102, 59–65.
- Gavvani, A.S., Mohite, H., Edrissian, G.H., Mohebbi, M., Davies, C.R., 2002. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 511–515.
- Gil Collado, J., 1977. Phlébotomes et leishmanioses en Espagne. *Colloques Internationaux du C. N. R. S.* 239, 177–190.
- Gradoni, L., 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain*, pp. 7–14.
- Guilvard, E., Gállego, M., Moreno, G., Fisa, R., Rispaill, P., Pratlong, F., Martínez-Ortega, E., Gállego, J., Rioux, J.A., 1996. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera-Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne). *Parasite* 3, 191–192.
- Iniesta, L., Fernández-Barredo, S., Bulle, B., Gómez, M.T., Piarroux, R., Gállego, M., Alunda, J.M., Portús, M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1137–1141.
- Iniesta, L., Gállego, M., Portús, M., 2007. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 119, 189–197.
- Jarvis, A., Reuter, H.I., Nelson, A., Guevara, E., 2008. Hole-filled seamless SRTM data V4. International Centre for Tropical Agriculture (CIAT). <http://srtm.csi.cgiar.org>
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobello, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health.* 13, 256–264.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F., 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 795–798.
- Martínez-Cruz, M.S., Martínez-Moreno, A., Martínez-Moreno, F.J., Martínez-Gómez, F., Hernández-Rodríguez, S., 1990. Epidemiología de la leishmaniasis canina en Córdoba. *Rev. Iber. Parasitol.* 50, 1–7.
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Gálvez, R., 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit. Vectors.* 5, 60.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 491–493.

- Molina, R., Lohse, J.M., Nieto, J., 2001. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet. Ther.* 2, 261–267.
- Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S.D., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Corpas-López, V., Martín-Sánchez, J., 2011. Leishmaniosis en la provincia de Cádiz (sur de España): seroprevalencia y factores de riesgo de la leishmaniosis canina e incidencia en humanos. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 70, 138–144.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Barón-López, S., Acedo-Sánchez, C., Martín-Sánchez, J., 2012. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniosis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol. Res.* 111, 155–164.
- Morillas, F., Sánchez Rabasco, F., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocana-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchís-Marín, M.C., 1996. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol. Res.* 82, 569–570.
- Morosetti, G., Bongiorno, G., Beran, B., Scalone, A., Moser, J., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2009. Risk assessment for canine leishmaniosis spreading in the north of Italy. *Geospatial Health.* 4, 115–127.
- Office International des Epizooties, 2000. Leishmaniosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines*, OIE (4th ed), pp. 803–812.
- Office International des Epizooties, 2008. Leishmaniosis. *Diagnostic techniques*. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, OIE (6th ed.), pp. 240–250.
- Pittaluga, G., 1912. Hallazgo de *Leishmania infantum* (protozoo parásito del "kala-azar infantil") en la costa de Levante de España. *Bol. Inst. Nac. Hig. Alfonso XIII* 8, 137–139.
- Pittaluga, G., 1913. Leishmaniosis espontánea del perro en la comarca de Tortosa. *Bol. Soc. Esp. Biol.* 2, 132–133.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Fisa, R., Aisa, M.J., Botet, J., Carrió, J., Castillejo, S., Iniesta, L., López, P., Montoya, L., Muñoz, C., Serra, T., Gállego, J., 2007. A review of human and canine leishmaniosis in Catalonia, and associated vector distribution. *Rev. Ibér. Parasitol.* 67, 59–67.
- Ready, P.D., 2008. Leishmaniosis emergence and climate change. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 27, 399–412.
- Ready, P.D., 2010. Leishmaniosis emergence in Europe. *Euro. Surveill.* 15, 19505.
- Riera, C., Valladares, E., 1996. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol. Today* 12, 412.
- Riera, C., Valladares, J.E., Gállego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J., Arboix, M., 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84, 33–47.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Destombes, P., Vollhardt, Y., Croset, H., 1971. Leishmaniose expérimentale du Renard *Vulpes vulpes*. *Récueil Méd. Vét.* 147, 489–498.
- Rioux, J.A., Aboulker, J.P., Lanotte, G., Killick-Kendrick, R., Martini-Dumas, A., 1985. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 21. Influence de la température sur le développement de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Étude expérimentale. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 3, 221–229.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniosis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.
- Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramis, A., Fernández-Bellón, H., Rodríguez, A., Ferrer, L., Alberola, J., 2005. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniosis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 815–818.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 165, 1–18.
- Zaffaroni, E., Rubaudou, L., Lanfranchi, P., Mignone, W., 1999. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). *Vet. Parasitol.* 81, 11–19.
- World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. WHO Technical Report Series no. 949. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf.

CAPÍTULO 4

Environmental and climatic factors influencing the distribution of *Leishmania infantum* vectors, *Phlebotomus ariasi* and *Phlebotomus perniciosus*, in Northeast Spain (Lleida, Catalonia)

INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES AMBIENTALES Y CLIMÁTICOS EN LA DISTRIBUCIÓN DE LOS VECTORES DE *LEISHMANIA INFANTUM*, *PHLEBOTOMUS ARIASI* Y *PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS*, EN EL NORESTE DE ESPAÑA (LLEIDA, CATALUNYA)

Cristina Ballart, Irene Guerrero, Xavier Castells, Sergio Barón, Maria Magdalena Alcover, Soledad Castillejo, Montserrat Portús, Montserrat Gállego

Enviado a PARASITES & VECTORS 2012

RESUMEN

En España, la leishmaniosis está causada por *Leishmania infantum*. El perro doméstico es el principal reservorio y dos especies de flebotomos, *Phlebotomus ariasi* y *Phlebotomus perniciosus*, actúan como vectores. El objetivo del presente estudio era determinar el rol de diversos factores ambientales y climáticos que afectan a la distribución y densidad de los vectores de *L. infantum*.

Durante el mes de Julio de 2006 se llevó a cabo un estudio entomológico en la provincia de Lleida mediante trampas adhesivas colocadas en los lugares de reposo de los adultos, a altitudes situadas entre los 86 y los 1755m s.n.m. (339 estaciones fueron muestreadas). Los resultados fueron analizados a través de análisis bivariante y multivariante.

Se capturó un total de 12.777 flebotomos y se identificaron hasta cinco especies con las siguientes densidades en orden decreciente: 32,5 especímenes/m² *Sergentomyia minuta*, 4,5 especímenes/m² *Phlebotomus perniciosus*, 1 espécimen/m² *P. ariasi*, 0,8 especímenes/m² *P. papatasi* y 0,2 especímenes/m² *P. sergenti*. El análisis bivariante revelaba que factores como la altitud, la zona bioclimática, la temperatura, la precipitación, el lugar de captura (ubicación respecto a la población, situación, categoría del lugar), presencia de vegetación en el muro, el hecho de tratarse de un parque natural, el ambiente general, la vegetación natural adyacente y la cobertura del suelo, estaban correlacionados de forma significativa con las densidades de los vectores, en algunas ocasiones en sentido opuesto en función de la especie. El modelo multivariante para *P. perniciosus* revelaba que su densidad se veía afectada por la situación del lugar de captura y la cobertura del suelo. Específicamente, las carreteras asfaltadas se correlacionaban de forma negativa con la densidad del vector (IRR: 0,41) y los terrenos de cultivo se correlacionaban de forma positiva (IRR: 4,59). En el caso de *P. ariasi*, se observaba una correlación positiva con respecto a la altitud y la zona bioclimática, con un incremento de la densidad por encima de los 800 m s.n.m. (IRR: 3,40) y un descenso en el bioclima mesomediterráneo (IRR: 0,08).

Environmental and climatic factors influencing the distribution of *Leishmania infantum* vectors, *Phlebotomus ariasi* and *Phlebotomus perniciosus*, in Northeast Spain (Lleida, Catalonia)

Cristina Ballart ^{1,2}
cristinaballartferrer@ub.edu

Irene Guerrero ³
irene.guerrero@uam.es

Xavier Castells ⁴
xavier.castells@uab.cat

Sergio Barón ⁵
serbalo@correo.ugr.es

M. Magdalena Alcover ^{1,2}
mmagdalenaalcoveramengual@ub.edu

Soledad Castillejo ^{1,2}
scastillejo@ub.edu

Montserrat Portús ¹
mportus@ub.edu

Montserrat Gállego ^{1,2,*}
*Corresponding author
mgallego@ub.edu

¹ Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

² Barcelona Center for International Health Research (CRESIB), Rosselló 132, 08036 Barcelona, Spain

³ Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

⁴ Servei de Genòmica i Bioinformàtica, Parc de Recerca UAB MRB-IBB, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

⁵ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus Universitario Cartuja, 18071 Granada, Spain

*Corresponding author: Montserrat Gállego at Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028-Barcelona, Spain, mgallego@ub.edu, phone number: +34934024502, fax number: +34934024504.

Abstract

Background

In Spain, leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum*. The domestic dog is the main reservoir host and two sand flies species, *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus*, are the proven vectors. The aim of the present study was to determine the role of specific environmental and climatic factors that affect the distribution and density of each of the *Leishmania infantum* vectors.

Methods

An entomological study was carried out in July 2006 in the province of Lleida with sticky traps set in their diurnal resting places at altitudes ranging from 86 to 1755 meters a.s.l. (339 sites were sampled). The results were analysed using bivariate and multivariate analysis.

Results

A total of 12,777 sand flies were captured and five species were identified with the following densities (specimens/m²): 32.5 of *Sergentomyia minuta*, 4.5 of *Phlebotomus perniciosus*, 1 of *P. ariasi*, 0.8 of *P. papatasi* and 0.2 of *P. sergenti*. The bivariate analysis revealed that factors such as altitude, bioclimatic zone, temperature, precipitation, sampling site (site relative to settlement, site situation, site category), vegetation in the wall, the fact of being in a natural park, general environment, adjacent natural vegetation and land cover were significantly associated with sand fly densities, sometimes in opposite ways, according to the vector species. The multivariate model for *P. perniciosus* revealed that its density was affected by the site situation and land cover of the sampling site. Specifically, paved drive correlated negatively with vector density (IRR: 0.41) and arable land cover correlated positively (IRR: 4.59). In the case of *P. ariasi*, a significant correlation was observed with the altitude and

bioclimatic zone, with density increasing over 800 m a.s.l. (IRR: 3.40) and decreasing in the meso-Mediterranean bioclimatic zone (IRR: 0.08).

Conclusion

Both species were found mainly in agricultural and forestry areas far from a domestic environment. However, the two species correlated differently with altitude, bioclimate, vegetation, temperature and precipitation, which emphasises the importance of their individual analysis in studies on the risk of leishmaniasis transmission.

Keywords: *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus perniciosus*, density, environmental factors, climatic factors, leishmaniasis, Lleida, Spain.

Background

Leishmaniasis, one of the world's most neglected diseases [75], is a parasitic disease that affects man and other mammals. It is transmitted by the bite of female phlebotomine sand flies, highly specialized haematophagous dipterans [5,25,38,48,49]. In the Mediterranean European foci, leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), and the domestic dog is the main reservoir host. Proven vectors are *Phlebotomus* sand flies belonging to the subgenus *Larrousius*: *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, and *P. tobbi* [10,38,43,49,54,55,60,67,75]. Until the 1980s, it was suspected that only one species was responsible for leishmania transmission in a specific leishmaniasis focus, but in Spain and Portugal it has been demonstrated that *P. perniciosus* and *P. ariasi* share the vectorial role in sympatric conditions [33,40,54].

Various anthropic factors, including demographic pressure, urbanization and exploitation of land for agriculture, have been thought to affect leishmaniasis distribution [17,21,25,50]. The opportunistic character of *L. infantum* and co-infection with HIV have influenced the re-emergence of the disease [5]. Also, changes in precipitation and temperature regimes related to climate change are thought to impact on the distribution of transmissible diseases such as leishmaniasis [19,42,60,75]. Long-term climate change could lead to suitable conditions for the occurrence of sand fly species in areas previously free of them [7,36,60] and for the expansion of leishmaniasis and its sand fly vectors [39,43,51,59,69,72,73,75].

The presence of vectors in areas currently free of leishmaniasis is considered to pose a significant risk for the emergence of the disease in temperate Europe [60]. Nevertheless, few studies have been published on the factors influencing the development of the *L. infantum* life cycle in proven vectors such as *P. ariasi* [63]. On the contrary, environmental and climatic factors affecting the presence and density of vectors have been reported recently [12,28,52].

In recent years, an increase in canine leishmaniasis has been observed in central and southern Spain [29] as well as the presence of the disease in northern areas [2,3,47], including the Pyrenean region of Lleida province [8]. However, only one partial entomological survey has been carried out in Lleida province [26] and no data on the factors influencing the distribution of leishmaniasis vectors in this region are available. The aim of the present entomological study, carried out within the framework of the European EDEN project (Emerging Diseases in a European changing eNvironment), was to determine the roles of specific environmental and climatic factors in the density and distribution of sand fly species, particularly the vectors of leishmaniasis, and consequently, the possible spread of the disease.

Methods

Study area

The province of Lleida is situated in the NE of Spain (Catalonia) bordering to the north with the Pyrenean areas of Andorra and France. It covers an extension of 12,173km² and is delimited by 4 fixed corners (42°51.7'N, 0°42.5'E; 41°16.5'N, 0°25.5'E; 42°18.4'N, 1°50.6'E; 41°40.3'N, 0°19.3'E). With a population of 470,496 inhabitants in 2006 (IDESCAT Institut d'Estadística de Catalunya; <http://www.idescat.cat>), Lleida is divided in 13 administrative divisions (counties): Alt Urgell, Alta Ribagorça, Garrigues, La Cerdanya, Noguera, Pallars Jussà, Pallars Sobirà, Pla d'Urgell, Segarra, Segrià, Solsonès, Urgell, Vall d'Aran (Figure 1), and covers a great variety of habitats. The altitude ranges widely from just over sea level to 3,143 m a.s.l. at the Pica d'Estats mountain, which results in notable differences in variables like temperature, rainfall, vegetation, etc. and thus constitutes an ideal study area. The climate varies from Mediterranean high-mountain in the north to continental in the central depression. The province of Lleida is defined by six bioclimatic zones: meso-Mediterranean

and supra-Mediterranean in the Ebro basin (Mediterranean region), and the Montane, Subalpine, Alpine and Coline are present in the Pyrenees (Medioeuropean region) [70]. The largest zone of the province is meso-Mediterranean (Figure 1).

Cross-sectional survey, sand fly collection and identification

A cross-sectional study was carried out in July 2006 in Lleida province. Sand flies were captured using sticky traps (20 cm x 20 cm sheets of paper covered in castor oil) set in their diurnal resting places [37,65] and recovered after four days. Due to the extent and physical characteristics of the region, traps were positioned along transects following the main roads in order to cover as much territory as possible [65]. A total of 4,100 sticky traps were recovered, that represents a surface of adhesion of 328 m² distributed among 339 stations (Table 1). Sand flies were removed with a brush and fixed in 95° alcohol for 2 days in order to dissolve the oil and were then definitively conserved in 70° alcohol until identification. Sand flies were identified on the basis of morphological characters following the keys of Gállego Berenguer et al. (1992). Males of all species and *Sergentomyia minuta* females were identified with a stereo microscope and *Phlebotomus* females were mounted in Hoyer's medium and identified with an optical microscope.

Data collection and environmental and meteorological variables

The characteristics of the stations, including location, habitat, environment and fauna, were recorded in a PDA (Palm Tungsten T5) using Pendragon Form v.5.0 software (PSC, Libertyville, IL, USA) and a GPS (Tom Tom Wireless GPS MK II) (Figure 2).

Maps were designed using ArcGIS 9.2 software (ESRI, Redlands, CA, USA). Temperature and rainfall data were provided by the *Servei Meteorològic de Catalunya* (MeteoCat). Data from the closest meteorological station were assigned for each sampling site using the spatial join-and-relate tool of ArcGis v.9.2 software and included temperature and precipitation mean values for different periods: Sampling Day 1 (traps set) to Day 4 (traps recovered), the month before Sampling Day 1 and the year before Sampling Day 1. The mean minimum winter temperature was also included as a variable. Precipitation for the sampling period Day 1–Day 4 was introduced in the analysis as a dichotomous variable (presence/absence). Altitude data for each geocoded collection site were extracted from a 90m resolution CGIAR Digital Elevation Model [35] using ArcGIS 9.2 software. In the same way, a 2.5m resolution CORINE shape from the CNIG (*Centro Nacional de Información Geográfica*) was used to extract the land cover as well as the bioclimatic zones associated with each sampling site [70].

Statistical analysis

As in other similar studies, the abundance of vector sand fly species was estimated as densities (number of sand flies per square metre of trap) [28,52]. The factors and categories considered are shown in Table 3.

The effect of different variables on the density of *P. perniciosus* and *P. ariasi* was assessed by generalised linear models based on negative binomial distribution. All computations were performed using R free software [58] and the function *glm.nb*, which is available in the MASS package. The exponential transformation of estimates provided by these models can be understood as an incidence risk ratio (IRR), as was interpreted in a previous study [28]. Thus, the IRR approach derived from our models describes how likely it is to find the vector in a given factor level compared to the reference level. For continuous variables, the IRR is

interpreted in the same way, but the risk changes per unit of that variable. That is, if an IRR equal to 1.2 is found for altitude (in meters), it means that the chances of finding the vector increases by 20% per meter. In contrast, if a factor has two levels, an IRR equal to 1.2 means that the chances of finding the vector increases by 20% in level two compared to level one. Bivariate models were computed for a set of key variables, both numerical and categorical. The statistical significance of exponential coefficients was evaluated using two tests. Firstly, the probability that each coefficient was different from zero was computed through a z-statistic. Secondly, a likelihood-ratio test (through a χ^2 statistic) was performed to assess if the coefficients from a given model were different from those from the null model or, equivalently, to assess whether at least one of the estimated exponential coefficients was different from zero.

Those variables resulting in a p-value < 0.2 were selected to fit a multivariate model for each vector [8,28]. In the case of closely correlated variables (temperature and precipitation) that could create interaction or confusion in the multivariate analysis, we retained those from the period sampled (mean daily temperature and daily precipitation). The variables resulting in a p-value ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Descriptive analysis

A total of 12777 sand fly specimens were captured in the province of Lleida. Five species were identified in the entomological survey: *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. sergenti* and *S. minuta*. Information on the number of specimens captured, sex ratio, relative abundance, frequency and density are provided in Table 2.

In the present study *P. ariasi* and *P. perniciosus*, proven vectors of human and canine leishmaniasis in the Iberian Peninsula, were captured in 10 and 11, respectively, of the 13 administrative divisions. *P. ariasi* was not captured in Garrigues, Pla d'Urgell and Segrià, and *P. perniciosus* was not found in Pla d'Urgell and Vall d'Aran. *P. ariasi* was present at altitudes from 273 to 1620m a.s.l., and *P. perniciosus* from 94 to 1630 m a.s.l. (Figure 3).

In the present study, *P. perniciosus* was detected in 138 sampling sites (41%) with a density of 4.5 specimens/m², while *P. ariasi* was present in 77 (23%), showing a low density of 1 specimen/m².

Bivariate analysis

The results obtained in the bivariate analysis of factors associated with *P. perniciosus* and *P. ariasi* densities are shown in Table 3. Statistically significant results ($p \leq 0.05$) were found for both species, which were affected differently by the factors.

The density of *P. perniciosus* was positively correlated with: bioclimatic zones (supra-Mediterranean IRR: 2.90 and meso-Mediterranean IRR: 3.93), temperature (mean daily temperature IRR: 1.18, mean monthly temperature IRR: 1.18, mean annual temperature IRR: 1.24 and mean minimal winter temperature IRR: 1.33), site relative to settlement (between villages IRR: 4.69 and at edge IRR: 3.59), situation of sites (unpaved tracks IRR: 2.48 and other places such as gardens, farm property, and other IRR: 2.36), site category (farm buildings IRR: 6.06), general environment (rural agriculture and forestry IRR: 4.37), adjacent natural vegetation (Aleppo pines IRR: 5.20 and garrigue shrubs IRR: 4.57), and corine land cover (arable IRR: 5.47). A negative correlation was found for: altitude (continuous variable IRR 0.99 and >800m IRR: 0.21), precipitation (mean monthly precipitation IRR: 0.69 and mean annual precipitation IRR: 0.89), and the fact of being a natural park (IRR: 0.10).

The density of *Phlebotomus ariasi* was positively correlated with: altitude (continuous IRR: 1 and >800m IRR: 4.98), precipitation (mean monthly precipitation IRR: 1.88 and mean annual precipitation IRR: 1.16), site relative to settlement (between villages IRR: 3.58), vegetation in the wall (with vegetation IRR: 2.90), the fact of being a natural park (IRR: 3.24), general environment (rural agriculture and forestry IRR: 5.44), adjacent natural vegetation (mountain pines IRR: 7.43 and oaks IRR: 3.42), and corine land cover (arable IRR: 3.57, pasture IRR: 22.06, garrigue shrubs IRR: 5.52 and forestry IRR: 13.10). The density was negatively correlated with: bioclimatic zones (supra-Mediterranean IRR: 0.43 and meso-Mediterranean IRR: 0.02), and temperature (mean daily temperature IRR: 0.89, mean monthly temperature IRR: 0.89, mean annual temperature IRR: 0.87, and mean minimal winter temperature IRR: 0.72).

Multivariate analysis

The final model for *P. perniciosus* revealed that the site situation and corine land cover affected vector density: specifically, paved drive correlated negatively (IRR: 0.41) and arable land cover correlated positively (IRR: 4.59) (Table 4). In the case of *P. ariasi*, the altitude and bioclimatic zone displayed a significant correlation, with vector density increasing over 800 m (IRR: 3.40) and decreasing in the meso-Mediterranean bioclimatic zone (IRR: 0.08) (Table 4).

Discussion

Studies carried out on the richness of sand fly species in Spain have identified 10 of the *Phlebotomus* genus (*P. papatasi*, *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. langeroni*, *P. mascittii*, *P. alexandri*, *P. sergenti*, *P. chabaudi*, *P. riouxi*, *P. fortunatarum*) and 2 of *Sergentomyia* (*S.*

fallax and *S. minuta*). One species is endemic to the Canary Islands (*P. fortunatarum*), where *S. fallax* has also been found, three are present only in the south of the Iberian Peninsula (*P. alexandri*, *P. chabaudi*, *P. riouxi*) and one is exclusive to the northeast (*P. mascittii*) [12,20,27,30,41,53]. As in other countries, this focalized geographical distribution of sand flies in Spain has been related with climatic and environmental characteristics, but only a few studies have investigated in-depth the influence of such variables on the local distribution of sand flies [12,28].

An entomological survey of sand flies was conducted in Lleida province in 1987 but in a very limited area [26]. No subsequent studies have been carried out despite human leishmaniasis cases appearing in the official epidemiological bulletins (BEC, <http://gencat.cat/salut/depsalut>) [9]. This motivated us to extend the entomological studies to the whole province.

In the present study, despite the increased number of sampling sites, we did not come across any new species not previously found in 1987. The 5 species of sand fly detected, also present elsewhere in the Iberian Peninsula, were *S. minuta*, *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti* and *P. papatasi*. As in other areas of Spain, the species captured in the greatest number was *S. minuta*, followed by *P. perniciosus*, one of the vectors of *L. infantum* [28,46,49]. These two ubiquitous species are found in a wide range of zones, from semi-arid to sub-humid [4,26,45,62] and from sea level up to 1500 m a.s.l. [10], which would explain the high detection in our study. Nevertheless, as has been well documented, it should be taken into account that results can be influenced by the method of capture, especially in the case of *P. ariasi*, the other *L. infantum* vector in the Iberian Peninsula, since it shows a higher abundance when CDC light traps are used, due to its phototropism [27,55]. Of the other two *Phlebotomus* species, *P. papatasi* has an affinity for per-arid and arid climates, being present

throughout the mesogen area of the Palaearctic region, while *P. sergenti* prefers semi-arid and arid zones of the Mediterranean regions [4,13,26].

In general, the use of sticky traps influences not only the relative abundance of different species captured, but also the sex ratio, providing more *Phlebotomus* males than females [13,46], or the opposite in the case of *S. minuta*, probably due to its feeding (herpetophilic) and breeding habits [13,27,28,30,41,46].

The results obtained show that the two vector species of *L. infantum* are present in Lleida province. Neither species was found in Pla d'Urgell county, where it was only possible to sample one station. *P. ariasi* was not present in the southern counties (Garrigues and Segrià), probably because this species mainly inhabits humid or sub-humid zones with cold winters [4,19,26,45,62,69], and *P. perniciosus* was not found in Vall d'Aran, which is the coldest and wettest county of Lleida province.

The presence of other leishmanial vectors, *P. sergenti* for *L. tropica* and *P. papatasi* for *L. major*, should also be noted considering the risk of the introduction of cutaneous leishmaniasis, due to the presence of an immigrant population coming from endemic areas, while it is also required the presence of suitable reservoirs [11].

Several studies have recently reported the influence of environmental and climatic conditions on the distribution of leishmaniasis vectors [7,12,28,43,52,56,57,69]. However, the present study is the first to show the effect of these variables separately on *P. ariasi* and *P. perniciosus* living in sympatric conditions in a given region. As could be observed in the bivariate analysis, the only factors to influence the density and distribution of both vectors were site relative to settlement, general environment and corine land cover, while the other variables affected the two species differently.

P. perniciosus showed a wide altitudinal range (94 to 1630 m a.s.l.) and though present in all the bioclimatic zones was found mainly below 800 m a.s.l., showing a preference for meso-Mediterranean and supra-Mediterranean bioclimates (70% of the positive stations were in the Mediterranean region), as reflected in the bivariate analysis (Table 3). In contrast, *P. ariasi* (273 to 1620 m a.s.l.), which was present at altitudinal ranges similar to *P. perniciosus*, was found above 800 m a.s.l. and in coline, subalpine and montane bioclimates (73% of the positive stations were in the Medieuropean region). In the multivariate analysis, only altitude and bioclimatic zones were significantly correlated with *P. ariasi*, whose density increased 3.4-fold over 800 m a.s.l. (p value=0.026) and decreased 0.08-fold at the meso-Mediterranean level (p value=0.001). Since other researchers have studied both species together and in bioclimatic zones that do not exactly match those of our study, no data are available to compare with our results [12,28]. It is generally accepted that altitude and bioclimate have an influence on sand fly distribution [10,12,23,28,31,32,52,69], and that the two Spanish leishmaniasis vectors are found along a climatic gradient ranging from humid to semi-arid [19]. Yet in our study area we were able to demonstrate that the vector correlation with altitude and bioclimate differed according to whether species preference was for humid or semi-arid zones.

The variables of altitude and bioclimate are closely correlated with changes in vegetation and meteorological conditions [22,32,52]. The influence of temperature has been considered not only on the biology and ecology of sand flies (rate of egg production, development of the juvenile stages, number of annual generations, feeding activity, period of activity and survival of adults) but also on the development of the parasite inside the vector [22,38,44,59,66,74]. Rainfall has been associated with the activity period of sand flies, particularly in some South American foci [56,57]. In the present study, both species were found in a similar range of climatic conditions. Thus, for example, *P. perniciosus* was

captured at mean daily temperatures (sampling Day1 to Day 4) in a range of 12.5°C-28.3°C and *P. ariasi* at 11.4-28°C. In spite of this, the two vectors differed in their correlation with meteorological variables (temperature and rainfall). In the bivariate analysis, *P. perniciosus* increased significantly with the different temperature measures considered (see Table 3) and correlated negatively with monthly and annual rainfall measures, while the opposite occurred with *P. ariasi*. It is reported that the lowest temperature for *P. ariasi* activity is about 15°C [6] and its optimal nocturnal temperature is 19-21°C [66] but no published data exists for *P. perniciosus*. In our study, we found both species at lower temperatures (mean daily temperatures 12.5 and 11.4, respectively). None of these variables were found to be statistically significant in the multivariate analysis, regardless of species.

It is assumed that in temperate regions higher temperatures may shorten larval development and extend the breeding season of existing sand flies or allow new species to become established where low temperatures have hitherto prevented their over-wintering [43], while declining autumn temperatures, together with the shortening day, induce diapauses of fourth instar larvae [61]. Nevertheless, conflicting results have been obtained by different authors on the influence of temperature on the presence, abundance or density of sand flies, depending on the species analyzed or the bioclimatic area considered [15,28,44]. These results indicate that temperature is not the only explanation for sand fly distribution and density [17,24,25].

In the bivariate analysis, significantly higher densities of both vector species were found in the areas between villages, and in the case of *P. perniciosus*, also at the village edge, which corresponds with other studies carried out in Spain [12,28]. The increased presence of vectors between villages could be favoured by the higher availability of oviposition and resting sites as well as the presence of a greater variety of animals constituting potential blood meals, considering the opportunistic feeding behaviour of both species [18,34,71].

As shown in the bivariate and multivariate analysis, *P. perniciosus* was found mainly on unpaved tracks and in places such as farm properties or gardens, rather than on paved roads and drives, which implies a preference for quiet places with food facilities, as observed by Gálvez et al. (2010a). This result corresponds with the maximum detection of *P. perniciosus* in farm buildings in a rural environment far away from villages. No significant differences were found in the case of *P. ariasi*, although this species was also found preferentially far away from villages. This result could be related with the positive correlation of this species with natural parks, unlike *P. perniciosus*, probably due to a preference for more natural environments and exophilic requirements.

The two species also showed different positive correlation with flora: *P. ariasi* with mountain pine and oak, and *P. perniciosus* with Aleppo pine and garrigue shrubs. This is related to their altitudinal and bioclimatic distribution, which has been described for the south of France [66].

Other variables such as wall and hole construction and hole interior conditions did not seem to affect the density of these vector species, in agreement with other authors [28].

Nevertheless, Barón et al. (2011) proposed PVC piping holes as a feasible control measure against leishmaniasis due to the decreased finding of *P. perniciosus* in this kind of hole construction.

Unlike other works [16,28], in our study aspect and shelter conditions of the sampling site were not correlated with vector density. Also the presence of animals (dogs, cats, birds and farm animals such as horses, cattle, sheep, pigs and goats) was not associated with vector density, in contrast with the results obtained in other studies in Spain or Morocco, which found the greatest densities of these sand flies in places where livestock or birds are present [12,28,31]. As in other studies carried out in Spain, the presence of dogs did not favour the

presence of either vector species [12,28], which is surprising considering the epidemiology of the disease caused by *L. infantum*, with the dog acting as a reservoir in a domestic zoonotic cycle. The opportunistic trophic behaviour of the vectors may have influenced these results [18,34,71].

The incrimination of a potential leishmaniasis vector in a given area has usually involved the species present in the highest density [45,46]. Studies in Spain have concluded that the potential vector of *L. infantum* in this country is *P. perniciosus*. Densities of 4-6 specimens/m² are considered to imply an increased risk of leishmaniasis emergence in France and Spain [44,64]. In the present study, *P. perniciosus* showed a higher density than *P. ariasi* and reached the minimal density considered a risk for transmission. Nevertheless, results on species sand fly composition may vary depending on the sampling techniques used [27] and also studies on the presence of kinetoplastida in sand flies have demonstrated the vectorial capacity of *P. ariasi* populations with low densities [33,40,49,67]. We found the two vector species together in 46 sampling sites (14%) where they could be acting in sympatric conditions in the transmission of the disease, as observed in other regions of Portugal and Spain [40,54,67].

Leishmaniasis is a climate-sensitive disease affected by changes in rainfall, atmospheric temperature and humidity, which can strongly impact on the ecology of vectors and reservoir hosts by altering their distribution and influencing their activity, survival and population sizes [7,19,22,24,38,60,74,75]. In the Mediterranean region, most leishmaniasis foci are between 5°C and 10°C in January isotherms and between 20 and 30°C in July [6]. Relatively small changes in temperature can have a considerable effect on vectorial capacity, due to alterations in the frequency of bloodmeals [60] and the development cycle of *Leishmania* promastigotes in sand flies [63]. Precipitation determines sand fly survival and promotes adult emergence and appropriate oviposition sites [24]. In this study, *P. ariasi* and *P. perniciosus* differed in

their correlation with temperature, precipitation, altitudinal and bioclimatic zones and vegetation. While *P. perniciosus* is considered the principal potential vector of leishmaniasis in the southern area of Lleida, *P. ariasi* could play this role in the northern and Pyrenean region, as occurs in France [68]. In fact, we have found *L. infantum* DNA in *P. ariasi* specimens [1] and demonstrated the existence of an autochthonous focus of canine leishmaniasis in this area [8,9].

Global change could alter the dynamics of leishmaniasis transmission, favouring or not its spread, emergence or re-emergence. It would thus be of interest in the future to analyse how the present results on vector distribution and density could be affected by climate change, considering that Spain is undergoing an increasing trend of 3.7°C/100 years (series of 1980-2006) [14]. A related issue that needs addressing is the hypothesis of an extension of *P. perniciosus* towards northern areas acquiring more tolerable summer temperatures, while it undergoes a decline in southern regions [36], or of an increase in the activity period and vectorial competence of *P. ariasi* in northern areas. Such observations have been made in the centre and south of Spain [28,44].

Conclusions

The bivariate analysis provided information about the risk factors affecting the density of *P. ariasi* and *P. perniciosus*. Both species were found mainly in agricultural and forestry areas far from a domestic environment. However, the two species correlated differently with altitude, bioclimate, vegetation, temperature and precipitation, which emphasises the importance of their individual analysis in studies on the risk of leishmaniasis transmission. A constant monitoring of sand fly vectors in new leishmaniasis foci is crucial for evaluating the geographical expansion of the disease. Studies on the parasitism of these species are required

to gain more insight into their involvement in the transmission of *L. infantum* in Lleida province.

Competing interests

The authors declare non-financial competing interests.

Authors' contributions

CB, MG and MP designed the survey and drafted the manuscript. CB, IG, MG and SB participated in the entomological field work. CB, IG, MMA and SC carried out the laboratory work. CB, MG and XC performed the statistical analysis of data. All the authors reviewed the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (AGL2004-06909-C02-01), Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Spain) (2009SGR385) and European Union (GOCE-2003-010284 EDEN, Emerging Diseases in a changing European eNvironment, www.edenfp6project.net). Thanks are due to Dr. Martín-Sánchez for reviewing the manuscript and for her helpful comments and to the Servei de Meteorologia de Catalunya that has provided the meteorological data for the study. Maria Rubio and Ester Cantó contributed to the field work capturing sand flies. CB was awarded a PhD student grant of the EDEN project. The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

References

1. Alcover MM, Gramiccia M, Di Muccio T, Ballart C, Castillejo S, Picado A, Bongiorno G, Portús M, Gállego M: **Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis.** *Parasitol Res* 2012, **111**:515-523.
2. Alvar Ezquerro JP: **Las leishmaniasis: de la biología al control.** In *Laboratorios Intervet S.A.* Edited by Gráficas Varona. Salamanca; 2001:69-75.
3. Amusatogui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro MA: **Seroprevalence of *Leishmania infantum* in Northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis.** *Ann NY Acad Sci* 2004, **1026**:154-157.
4. Aransay AM, Testa JM, Morillas-Márquez F, Lucientes J, Ready PD: **Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain.** *Parasitol Res* 2004, **94**:416-420.
5. Ashford RW: **The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses.** *Int J Parasitol* 2000, **30**:1269-1281.
6. Ashford RW, Bettini S: **Ecology and epidemiology: Old World.** In *The leishmaniasis in biology and medicine I. Biology and epidemiology.* Edited by Peters W, Killick-Kendrick R. London: Academic Press; 1987:365-424.
7. Aspöck H, Gerersdorfer, T, Formayer H, Walochnik J: **Sand flies and sand fly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change.** *Wien Klin Wochenschr* 2008, **120**:24-29.

8. Ballart C, Alcover MM, Picado A, Nieto J, Castillejo S, Portús M, Gállego M: **First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study.** *Pre Vet Med* 2012a, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.003>.
9. Ballart C, Alcover MM, Portús M, Gállego M: **Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012b, **106**:134-136.
10. Ballart C, Barón S, Alcover MM, Portús M, Gállego M: **Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*.** *Acta Trop* 2012c, **122**:155-159.
11. Barón S, Martín-Sánchez J, Gállego M, Morales-Yuste M, Boussa S, Morillas-Márquez F: **Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco.** *Acta Trop* 2008, **107**:259-267.
12. Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Irigaray C, Martín-Sánchez J: **Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease.** *Parasitology* 2011, **138**:1234-1244.
13. Boussaa S, Neffa M, Pesson B, Boumezzough A. **Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of southern Morocco: results of entomological surveys along the Marrakech-Ouarzazat and Marrakech-Azilal roads.** *Ann Trop Med Parasitol* 2010, **104**:163-170.
14. Brunet M, Casado MJ, de Castro M, Galán P, López JA, Martín JM, Pastor A, Petisco E, Ramos P, Ribalaygua J, Rodríguez E, Sanz I, Torres L: **Generación de escenarios regionalizados de cambio climático para España.** In *Agencia Estatal de Meteorología*.

Edited by Ministerio de Medioambiente y Medio Rural y Marino, Gobierno de España. Spain; 2009.

15. Chamailé L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P, Dedet JP: **Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France.** *Parasit Vectors* 2010, 8:3-31.
16. Coleman RE, Burkett DA, Sherwood V, Caci J, Spradling S, Jennings BT, Rowton E, Gilmore W, Bount K, White CE, Putnam JL: **Impact of phlebotomine sand flies on United State military operations at Tallil Air Base, Iraq 2. Temporal and geographic distribution of sand flies.** *J Med Entomol* 2007, 44:29-41.
17. Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D: **Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives.** *Vet Parasitol* 2011, 182:14-21.
18. de Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Aisa MJ, Wolff M, Seguí MG: **Identification of Blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Biotin/Avidin Method.** *J Med Entomol* 1995, 32:229-233.
19. de La Rocque S, Rioux JA, Slingenbergh J: **Climate change: effects on animal disease systems and implications for surveillance and control.** *Rev Sci Tech Int Epiz* 2008, 27:339-354.
20. Depaquit J, Léger N, Killick-Kendrick R: **Description de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *riouxi* .sp. (Diptera - Psychodidae) d'Afrique du Nord.** *Parasite* 1998, 5:151-158.
21. Desjeux P: **The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, 95:239-243.

22. Elnaiem DA, Connor SJ, Thomson MC, Hassan MM, Hassan HK, Aboud MA, Ashford RW: **Environmental determinants of the distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan.** *Ann Trop Med Parasitol* 1998, **92**:877-887.
23. Ferreira AL, Sessa PA, Varejão JB, Falqueto A: **Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, **96**:1061-1067.
24. Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes EB: **Climate and Vectorborne Diseases.** *Am J Prev Med* 2008, **35**:436-450.
25. Gállego M: **Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis.** *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2004, **23**:661-676.
26. Gállego M, Rioux JA, Rispaïl P, Guilvard E, Gállego J, Portús M, Delalbre A, Bastien P, Martínez-Ortega E, Fisa R: **Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña).** *Rev Ibér Parasitol* 1990, **50**:123-127.
27. Gállego Berenguer J, Botet J, Gállego M, Portús M: **Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura.** In *In Memoriam al Prof. Dr. D.F. de P. Martínez Gómez*. Edited by Hernández, S. Publicaciones de la Universidad de Córdoba; 1992:581-600.
28. Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, Martín O, Dos Santos-Brandao F, Guerrero I, Cubero E, Molina R: **Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain.** *Acta Trop* 2010a, **115**:95-102.

29. Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R: **Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain).** *Vet Parasitol* 2010b, **169**:327-334.
30. Gil Collado J, Morillas F, Sanchís MC: **Los flebotomos en España.** *Revista de Sanidad e Higiene Pública* 1989, **63**:15-34.
31. Guernaoui S, Boumezzough A: **Habitat Preferences of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Southwestern Morocco.** *J Med Entomol* 2009, **46**:1187-1194.
32. Guernaoui S, Boumezzough A, Laamrani A: **Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission.** *Acta Trop* 2006, **97**:346-351.
33. Guilvard E, Gállego M, Moreno G, Fisa R, Rispaill P, Pratlong F, Martínez-Ortega E, Gállego J, Rioux JA: **Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera-Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne).** *Parasite* 1996, **3**:191-192.
34. Guy MW, Killick-Kendrick R, Gill GS, Rioux JA, Bray RS: **Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses.** *Ann Parasitol Hum Comp* 1984, **59**:449-458.
35. Jarvis A, Reuter HI, Nelson A, Guevara E: **Hole-filled seamless SRTM data V4, International Centre for Tropical Agriculture (CIAT) 2008** [<http://srtm.csi.cgiar.org>]
36. Kuhn KG: **Global warming and leishmaniasis in Italy.** *Trop Med Int Health* 1999, **7**:1-2.
37. Killick-Kendrick R: **Investigation of phlebotomine sandflies.** *Indo-UK Workshop on leishmaniosis* 1983, 72-83.

38. Killick-Kendrick R: **The biology and control of Phlebotomine sand flies.** *Clin Dermatol* 1999, **17**:279-289.
39. Kovats RS, Campbell-Lendrum DH, McMichael AJ, Woodward A, Cox JH: **Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease?** *Phil Trans R Soc Lond B* 2001, **356**:1057-1068.
40. Lucientes-Curdi J, Sánchez-Acedo c, Castillo Hernández JA, Estrada Peña A: **Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniosis de Zaragoza.** *Rev Ibér Parasitol* 1988, **48**:7-8.
41. Lucientes J, Zárata JJ, Arbea JI, Carles-Tolrá M, Pujade-Villar J: **Primeras citas de flebotominos (Diptera: Psychodidae) para Andorra.** *Boletín S.E.A* 2001, **28**:129-130.
42. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L: **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern.** *Med Vet Entomol* 2012, DOI: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.
43. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L: **The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors.** *Trop Med Int Health* 2008, **13**:256-264.
44. Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V, Morillas-Márquez F: **Canine leishmaniasis in southeastern Spain.** *Emerg Infect Dis* 2009, **15**:795-798.
45. Martínez-Ortega E: **Los flebotomos ibéricos (Diptera: Psychodidae). I. Almería.** *Ann Biol* 1985a, **3**:107-111.
46. Martínez-Ortega E: **Los flebotomos ibéricos (Diptera: Psychodidae). II. El sureste.** *Ann Biol* 1985b, **3**:113-119.

47. Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D, Gálvez R: **Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain.** *Parasit Vectors* 2012, DOI: 10.1186/1756-3305-5-60.
48. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J: **Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994, **88**:491-493.
49. Morillas F, Sánchez Rabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, Sanchís-Marín MC: **Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector.** *Parasitol Res* 1996, **82**:569-570.
50. Morillas Márquez F: **Climate change and infectious diseases in Europe: leishmaniasis and its vectors in Spain** 2010 [<http://www.thelancet.com/infection>].
51. Morosetti G, Bongiorno G, Beran B, Scalone A, Moser J, Gramiccia M, Gradoni I, Maroli M: **Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy.** *Geospatial Health* 2009, **4**:115-127.
52. Ozbel Y, Balcioglu IC, Olgen MK, Simsek FM, Töz SÖ, Ertabaklar H, Demir S, Alkan MZ: **Spatial distribution of phlebotomine sand flies in the Aydin Mountains and surroundings: the main focus of cutaneous leishmaniasis in western Turkey.** *J Vector Ecol* 2011, **36**:99-105.
53. Pesson B, Ready JS, Benabdennbi I, Martín-Sánchez J, Esseghir S, Cadi-Soussi M, Morillas-Márquez F, Ready PD: **Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif.** *Med Vet Entomol* 2004, **18**:25-37.
54. Pires CA: **Les Phlébotomes du Portugal. I. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 par *Leishmania*,**

- dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal).** *Ann Parasitol Hum Comp* 1984, **59**:521-524.
55. Portús M, Gállego M, Riera C, Fisa R, Aisa MJ, Botet J, Carrió J, Castillejo S, Iniesta L, López P, Montoya L, Muñoz C, Serra T, Gállego J: **A review of human and canine leishmaniosis in Catalonia and associated vector distribution.** *Rev Ibér Parasitol* 2007, **67**:59-67.
56. Queiroz MF, Varjão JR, Moraes SC, Salcedo GE: **Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva, 1912).** *Rev Soc Bras Med Trop* 2012, **45**:313-317.
57. Quintana M, Salomón O, Guerra R, Lizarralde DE, Grosso M, Fuenzalida A: **Phlebotomine of epidemiological importance in cutaneous leishmaniasis in northwestern Argentina: risk maps and ecological niche models.** *Med Vet Entomol* 2012, DOI:10.1111/j.1365-2915.2012.01033.x.
58. R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing.** **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.** ISBN 3-900051-07-0. 2012 [http://www.R-project.org]
59. Ready PD: **Leishmaniasis emergence and climate change.** *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2008, **27**:399-412.
60. Ready PD: **Leishmaniasis emergence in Europe.** *Euro Surveill* 2010, **15**:19505.
61. Ready PD, Croset H: **Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera: Psychodidae) from southern France.** *Bull Entomol Res* 1980, **70**:511-523.
62. Rioux JA: **Le paradigme "écopathologie" II - Son application à l'épidémiologie des leishmanioses.** *Académie des Sciences et Lettres de Montpellier* 2006:35-46.

63. Rioux JA, Aboulker JP, Lanotte G, Killick-Kendrick R, Martini-Dumas A: **Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 21. Influence de la température sur le développement de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Étude expérimentale.** *Ann Parasitol Hum Comp* 1985, **3**:221-229.
64. Rioux JA, Croset H, Lanotte G: **Écologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation.** *Colloque International du C.N.R.S.* 1977, **39**:295-305.
65. Rioux JA, Golvan YJ, Croset H, Hoiun R, Juminer B, Bain O, Tour S: **Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 1. Les Phlébotomes (Echantillonnage - Ethologie).** *Ann Parasitol Hum Comp* 1967, **42**:561-603.
66. Rioux JA, Golvan YJ, Croset H, Tour S, Abonnenc E, Petitdidier M, Vollhardt Y, Dedet JP, Albaret JL, Lanotte G, Quilici M: **Epidémiologie des Leishmanioses dans le Sud de la France.** In *Monographie 37*. Edited by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Paris 1969.
67. Rioux JA, Guilvard E, Gállego J, Moreno G, Pratlong F, Portús M, Rispaill P, Gállego M, Bastien P: **Intervention simultanée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *P. perniciosus* Newstead 1911 dans un même foyer. Infestations par deux zymodemes synoptiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne).** In *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. Montpellier: IMEEE 1986:439-444.
68. Rioux JA, Jarry DM, Lanotte G, Maazoun R, Killick-Kendrick R: **Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France 18. Identification enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, isole de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 spontanément infeste en Cévennes.** *Ann Parasitol Hum Comp* 1984, **59**:331-333.

69. Risipail P, Dereure J, Jarry D: **Risk zones of human Leishmaniases in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**:477-483.
70. Rivas-Martínez S: **Pisos bioclimáticos de España.** Edited by Lazaroa 1983, **5**:33-43.
71. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M: **Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy.** *Acta Trop* 2008, **105**:158-165.
72. Semenza JC, Menne B: **Climate change and infectious diseases in Europe.** *Lancet Infect Dis* 2009, **9**:365-375.
73. Sutherst RW: **Global change and human vulnerability to vector-borne diseases.** *Clin Microbiol Rev* 2004, **17**:136-173.
74. Tarallo VD, Dantas-Torres F, Lia RP, Otranto D: **Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy.** *Acta Tropica* 2010, **116**:227–234.
75. World Health Organization: **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** In *WHO Technical Report Series 2010* [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf]

Figure 1 Study area of Lleida province: counties and bioclimatic zones.

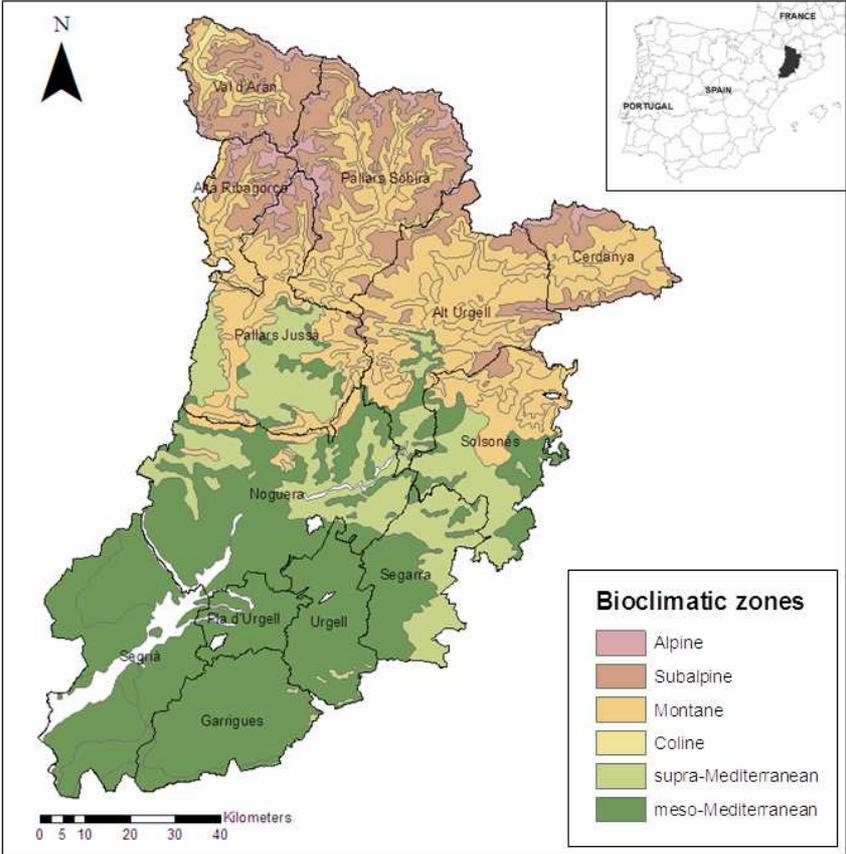


Figure 2 Variables of location, collection method, habitat, environment and fauna of the sampling sites.

LOCATION			
Site		Closest settlement	
Altitude		Road	
Altitude method		Distance to settlement	
Comments on location			
COLLECTION			
Collection method		Traps recovered	
Traps set		Date/Time recovered	
Date/Time set		Traps on ground	
Comments on collection		Wetness of paper	
		Holes in paper	
		Snails	
		Still sticky	
HABITAT			
Site relative to settlement		Wall construction	
Situation of site		Hole construction	
Site category		Hole interior	
Aspect		Wetness of hole	
Slope		Vegetation on wall	
Sheltered		Well present	
Water course		Refuse bin present	
Water flowing		Comments on habitat	
ENVIRONMENT			
Natural park?		Adjacent land cover (predominant)	
General Environment		Adjacent land cover (second predominant)	
Nearby natural vegetation (100m-1km)		Adjacent Arable (predominant)	
Nearby natural vegetation (0-100m)		Adjacent Arable (second predominant)	
Adjacent natural vegetation (100m-1km)		Adjacent Garden (predominant)	
Adjacent natural vegetation (0-100m)		Adjacent Garden (second predominant)	
FAUNA			
Dogs	Cattle	Goats	Ducks
Cats	Sheep	Rabbits	Pigeons/Doves
Equines	Pigs	Chickens	Other large birds

Figure 3 Density of *P. ariasi* and *P. perniciosus* at different altitudinal ranges in the counties of Lleida province.

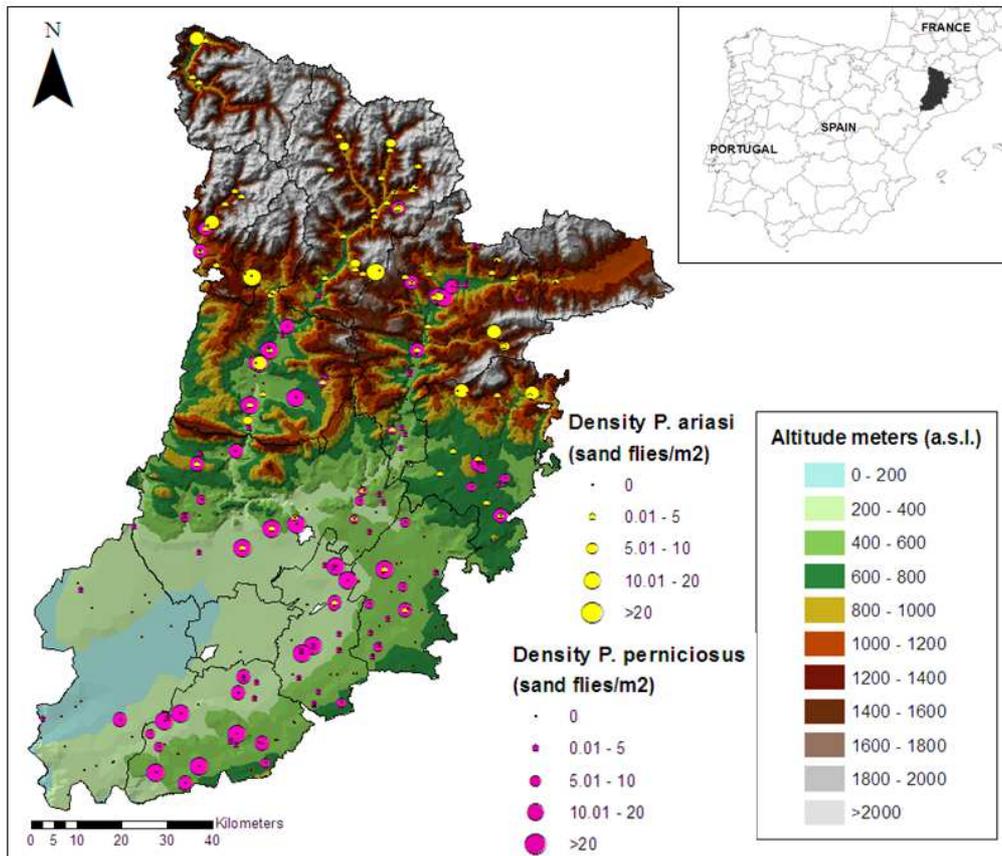


Table 1: Number of surveyed points, number of sticky traps recovered, surface of adhesion (square meters), altitude ranges (meters) and geographical coordinates for the different counties of Lleida province.

County	N of surveyed points	N of sticky traps recovered	Surface of adhesion (m ²)	Altitude ranges (m)	Geographical coordinates
Alt Urgell	42	535	42.8	400-1700	42°21.5'N, 1°27.8'E
Alta Ribagorça	13	187	14.96	800-1600	42°24.6'N, 0°44.6'E
Garrigues	35	442	35.36	200-800	41°31.3'N, 0°52.2'E
La Cerdanya	2	40	3.2	900-1000	42°26'N, 1°55.7'E
Noguera	30	280	22.4	200-1000	41°47.5'N, 0°48.5'E
Pallars Jussà	33	484	38.72	300-1500	42°10.1'N, 0°53.8'E
Pallars Sobirà	43	529	42.32	500-1400	42°24.7'N, 1°7.9'E
Pla d'Urgell	1	14	1.12	200-300	41°37.9'N, 0°53.8'E
Segarra	36	392	31.36	300-800	41°40.2'N, 1°16.4'E
Segrià	24	275	22	0-500	41°37.2'N, 0°37.6'E
Solsonès	31	287	22.96	600-1400	41°59.8'N, 1°31.3'E
Urgell	28	379	30.32	200-700	41°39'N, 1°8.5'E
Vall d'Aran	21	256	20.48	600-1800	42°42.2'N, 0°47.8'E
Total	339	4100	328	0-1800	-

Table 2: Number, sex ratio, relative abundance, frequency and density of sand flies captured in Lleida province.

Species	Number	Sex ratio (F:M)	Relative abundance (%)*	Frequency (%)*	Density (n/m ²)*
<i>P. ariasi</i>	330	1:3	2.58	22.71	1
<i>P. perniciosus</i>	1491	1:3	11.67	40.71	4.5
<i>P. sergenti</i>	52	1:2	0.41	4.72	0.2
<i>P. papatasi</i>	253	1:1	1.98	11.50	0.8
<i>S. minuta</i>	10651	1:1	83.36	47.20	32.5
Total	12777	1:1	-	-	39

*Relative abundance: relative number of sand flies of one species related to the total number of sand flies captured expressed in percentage (%). Frequency: relative number of positive stations related to the total number of stations sampled expressed in percentage (%). Density: number of specimens captured per square metre of sticky trap.

Table 3: Factors studied in the cross-sectional study and results obtained in the bivariate analysis. Risks expressed as Incidence Risk Ratio (IRR), 95% Confidence Intervals (95% CI) and p-value. Variables with a p-value ≤ 0.05 were considered significant.

	N	(%)	<i>P. perniciosus</i> Bivariate		<i>P. ariasi</i> Bivariate	
			IRR (95%CI)	p-value	IRR (95%CI)	p-value
Altitude (m)¹	700 (86-1755)	438-949*	0.99 (0.99-0.99)	1.993*10 ⁻³	1.00 (1.002-1.003)	1.128*10 ⁻³
Altitude (m)						
< 800	221	(65)	Ref.		Ref.	
≥ 800	118	(35)	0.21 (0.12-0.37)	6.647*10 ⁻³	4.98 (2.67-9.28)	3.670*10 ⁻⁷
Bioclimatic zone						
Coline, Montane, Subalpine	142	(42)	Ref.		Ref.	
supra-Mediterranean	76	(22)	2.90 (1.44-5.85)	0.003	0.43 (0.22-0.87)	0.019
meso-Mediterranean	121	(36)	3.93 (2.13-7.25)	1.020*10 ⁻³	0.02 (0.01-0.07)	1.803*10 ⁻¹²
Mean daily temperature (°C)¹ (sampling Day1 (traps set) to Day4 (traps recovered))	22.3 (11.36-28.28)	5.1**	1.18 (1.12-1.25)	2.585*10 ⁻¹⁰	0.89 (0.84-0.94)	1.884*10 ⁻⁴
Mean monthly temperature (°C)¹ (the month before sampling Day 1)	21.1 (11.06-27.67)	5.2**	1.18 (1.12-1.25)	1.170*10 ⁻¹⁰	0.89 (0.84-0.94)	1.661*10 ⁻⁴

Mean annual temperature (°C) ¹ (the year before sampling Day 1)	10.4 (2-15)	4.5**	1.24 (1.16-1.31)	6.326*10 ⁻¹²	0.87 (0.81-0.93)	7.395*10 ⁻³
Mean minimal winter temperature (°C) ¹	-2.7(-7.3-0.3)	-2.4**	1.33 (1.19-1.49)	2.159*10 ⁻⁷	0.72 (0.64-0.81)	2.537*10 ⁻⁷
Daily precipitation						
Absent	136	(40)	Ref.		Ref.	
Present	203	(60)	1.11 (0.62-1.95)	0.730	1.46 (0.74-2.86)	0.265
Mean monthly precipitation (mm) ¹ (the month before sampling Day 1)	1.7 (0.03-5.79)	1.6**	0.69 (0.58-0.82)	2.787*10 ⁻³	1.88 (1.56-2.27)	2.664*10 ⁻¹¹
Mean annual precipitation (mm) ¹ (the year before sampling Day 1)	15.2 (5.2-34.1)	6.7**	0.89 (0.85-0.92)	1.1652*10 ⁻⁸	1.16 (1.11-1.21)	2.556*10 ⁻¹¹
Site relative to settlement						
Within	124	(37)	Ref.		Ref.	
Edge	112	(33)	3.59 (1.88-6.84)	9.523*10 ⁻³	1.13 (0.52-2.46)	0.751
Between	103	(30)	4.69 (2.43-9.06)	3.711*10 ⁻⁹	3.58 (1.67-7.68)	0.001
Situation of site						
Paved road	169	(50)	Ref.		Ref.	

Paved drive	60	(18)	1.16 (0.54-2.47)	0.701	0.60 (0.24-1.48)	0.268
Unpaved track	44	(13)	2.48 (1.06-5.79)	0.034	0.36 (0.12-1.03)	0.057
Other (garden, farm property, other)	66	(19)	2.36 (1.14-4.88)	0.020	0.58 (0.24-1.38)	0.220
Site category						
Embankment	164	(48)	Ref.		Ref.	
Wall	82	(24)	1.07 (0.54-2.11)	0.841	0.70 (0.31-1.58)	0.394
Farm building	10	(3)	6.06 (1.20-30.44)	0.028	0.05 (0.00-1.28)	0.070
Other	83	(25)	1.32 (0.67-2.61)	0.411	0.72 (0.32-1.61)	0.425
Aspect						
Other (not applicable)	24	(8)	Ref.		Ref.	
North-facing	93	(27)	0.37 (0.11-1.18)	0.092	0.76 (0.18-3.09)	0.708
East-facing	31	(9)	0.45 (0.11-1.78)	0.255	1.07 (0.20-5.58)	0.927
South-facing	156	(46)	0.37 (0.12-1.13)	0.082	2.62 (0.70-9.81)	0.150
West-facing	35	(10)	0.60 (0.15-2.27)	0.451	1.69 (0.34-8.20)	0.513
Sheltered						
Not sheltered	267	(79)	Ref.		Ref.	

Sheltered	42	(12)	0.81 (0.34-1.87)	0.609	0.64 (0.23-1.79)	0.399
Unsure	30	(9)	0.54 (0.20-1.48)	0.236	0.65 (0.20-2.15)	0.487
Drain hole wall construction						
Other	39	(12)	Ref.		Ref.	
Stone	272	(80)	1.093 (0.35-3.39)	0.877	2.94 (0.84-7.39)	0.098
Brick	28	(8)	1.102 (0.31-3.92)	0.880	1.41 (0.29-6.68)	0.662
Drain hole construction						
Other	7	(2)	Ref.		Ref.	
Unlined	179	(53)	3.67 (0.47-28.68)	0.212	8.60 (0.46-160.52)	0.148
Brick lined	23	(7)	2.08 (0.21-20.55)	0.527	4.88 (0.20-114.54)	0.322
Cement pipe	61	(18)	5.85 (0.70-48.75)	0.101	4.31 (0.21-86.30)	0.338
Plastic pipe	69	(20)	3.87 (0.47-31.93)	0.206	3.97 (0.20-78.81)	0.363
Hole interior						
Other (bare and other)	10	(3)	Ref.		Ref.	
Dust	264	(78)	1.33 (0.25-8.88)	0.730	0.51 (0.07-3.34)	0.482
Dust with vegetation	36	(11)	0.90 (0.18-6.89)	0.904	0.48 (0.05-3.95)	0.497

Soil with vegetation	29	(8)	0.37 (0.05-2.48)	0.308	0.30 (0.03-2.65)	0.277
Vegetation on the wall						
No	266	(78)	Ref.		Ref.	
Yes	73	(22)	0.86 (0.43-1.69)	0.665	2.90 (1.36-6.15)	0.005
Natural park						
No	269	(79)	Ref.		Ref.	
Yes	70	(21)	0.10 (0.05-0.22)	7.174*10 ⁻¹⁰	3.24 (1.52-6.90)	0.002
General environment						
Other (other settlement and other)	44	(13)	Ref.		Ref.	
Rural agriculture and forestry	106	(31)	4.37 (1.77-10.74)	0.001	5.44 (1.83-16.17)	0.002
Rural village	189	(56)	1.61 (0.69-3.76)	0.263	1.74 (0.61-4.69)	0.292
Adjacent natural vegetation						
None	31	(9)	Ref.		Ref.	
Mountain pine	17	(5)	0.40 (0.08-1.95)	0.527	7.43 (1.43-38.39)	0.016
Oak	86	(26)	2.12 (0.75-6.01)	0.154	3.42 (1.02-11.41)	0.045
Aleppo pine	31	(9)	5.20 (1.50-18.02)	0.009	1.29 (0.29-5.68)	0.727

Garrigue shrubs	119	(35)	4.57 (1.68-12.43)	0.003	1.18 (0.36-3.88)	0.775
Valley alder	31	(9)	1.14 (0.32-4.05)	0.837	2.92 (0.69-12.22)	0.140
Other	24	(7)	0.87 (0.22-3.43)	0.844	0.07 (0.00-1.13)	0.061
Corine land cover						
Rural, industrial or commercial area	42	(12)	Ref.		Ref.	
Arable	189	(56)	5.47 (2.30-12.98)	1.076*10 ⁻¹	3.57 (1.08-11.72)	0.035
Pasture	37	(11)	1.16 (0.37-3.67)	0.792	22.06 (5.68-89.88)	8.827*10 ⁻⁰
Garrigue shrubs	27	(8)	2.18 (0.63-7.50)	0.212	5.52 (1.21-25.15)	0.027
Forestry	44	(13)	1.59 (0.53-4.73)	0.402	13.10 (3.39-50.53)	1.766*10 ⁻¹
Dogs						
Not seen	230	(68)	Ref.		Ref.	
Seen	109	(32)	1.41 (0.78-2.55)	0.252	0.81 (0.40-1.65)	0.576
Cats						
Not seen	291	(86)	Ref.		Ref.	
Seen	48	(14)	1.31 (0.58-2.89)	0.510	0.68 (0.26-1.77)	0.428
Farm animals						

(horses/cattle/sheep/pigs/goats)									
Not seen	265	(78)	Ref.				Ref.		
Seen	74	(2)	1.91 (0.98-3.70)	0.056			2.04 (0.94-4.41)		0.068
Birds (chickens/ducks/pigeons/other large birds)									
Not seen	273	(81)	Ref.				Ref.		
Seen	66	(19)	1.63 (0.81-3.28)	0.166			0.55 (0.23-1.29)		0.170

N, number of sampling stations; %, percentage of sampling stations; Ref, reference category

¹ variable used as continuous in the model. For these variables N is substituted by mean, minimum and maximum values in brackets, and % by

interquartile range (IQR)* or standard deviation (SD)**

Table 4. Results obtained in the multivariate model. Risks expressed as Incidence Risk Ratio (IRR), 95% Confidence Intervals (95% CI) and p-value. Variables with a p-value ≤ 0.05 were considered significant.

Variable	Multivariate analysis		
	IRR	(95% CI)	p-value
<i>P. perniciosus</i>			
Situation of site			
Paved road	Ref.		
Paved drive	0.41	(0.19-0.88)	0.022
Unpaved track	1.32	(0.58-2.99)	0.492
Other	0.89	(0.42-1.92)	0.766
Corine land cover			
Rural, industrial or commercial area	Ref.		
Arable	4.59	(1.79-11.76)	0.001
Pasture	3.58	(0.87-14.63)	0.075
Garrigue shrubs	3.78	(0.95-14.95)	0.057
Forestry	1.62	(0.39-6.69)	0.502
<i>P. ariasi</i>			
Altitude			
<800m	Ref.		
$\geq 800m$	3.40	(1.15-10.05)	0.026
Bioclimatic zones			
Other	Ref.		
supra-Mediterranean	1.12	(0.35-3.57)	0.844
meso-Mediterranean	0.08	(0.02-0.39)	0.001

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Hasta hace poco tiempo, se consideraba que la leishmaniosis causada por *Leishmania infantum* en Europa estaba presente principalmente en la cuenca Mediterránea. Sin embargo, en los últimos años la enfermedad ha sufrido un incremento en su prevalencia en algunas áreas clásicamente consideradas endémicas (Gálvez y col., 2010b; Martín-Sánchez y col., 2009) y/o se ha expandido y emergido en otras zonas previamente consideradas indemnes (Bogdan y col., 2001; Dereure y col., 2009; Maroli y col., 2008). Así, la presencia de leishmaniosis humana y canina autóctona ha sido reportada en el último decenio en países del norte y del este de Europa (Bogdan y col., 2001; Naucke y col., 2008; Naucke y Schmitt, 2004).

Sin embargo, para poder hablar de emergencia y/o reemergencia de una enfermedad en un área se precisa disponer de datos históricos que puedan ser comparados con la situación actual, hecho que no ocurre en algunos de los trabajos publicados acerca de la emergencia de la leishmaniosis. Estos datos pueden estar relacionados con la presencia y densidad del vector y la existencia de casos en los humanos y en el reservorio. Además, los desplazamientos de personas y animales durante la época estival, en que puede tener lugar la transmisión vectorial, hace que en muchos casos se desconozca el origen de la enfermedad.

El estudio de la leishmaniosis en España es muy fragmentario y los datos de que se disponía permitían observar una distribución heterogénea de la enfermedad. La existencia de casos de leishmaniosis humana y de los vectores en la provincia de Lleida fue lo que nos indujo a estudiar la zona en profundidad (Gállego y col., 1990; Portús y col., 2007).

Muchos de los estudios epidemiológicos llevados a cabo sobre las leishmaniosis empiezan con el estudio entomológico para ver si en un área determinada se encuentra el o los vectores, ya que éste es el factor determinante para la presencia de la enfermedad (Ready, 2008, 2010; Rioux y col., 1970), aún cuando se han citado otras vías de transmisión (Boggiatto y col., 2011; Duprey y col., 2006; Rosypal y col., 2005; Silva y col., 2009). Este fue el primer tipo de estudio que iniciamos en el año 2006 en toda la provincia de Lleida, a pesar de que es el último incluido en la presente memoria, que se extendió en el año 2007 a Andorra. La gran cantidad de material a preparar para el estudio morfológico y la identificación de los especímenes de flebotomos capturados en Lleida, junto a la elaboración de una base de datos, con mucha información y que presentó dificultades para su tratamiento, motivaron la

secuencia de los artículos que componen la presente memoria doctoral. Los resultados del estudio entomológico se han publicado en 2 artículos, uno de Andorra (ver Capítulo 2) y otro de la provincia de Lleida (ver Capítulo 4).

Durante el trabajo de campo para la captura de los flebotomos se pudo detectar la presencia de un perro con síntomas compatibles con la leishmaniosis canina en la zona pirenaica de la provincia de Lleida y que no había salido de la zona (ver Capítulo 1). Dada la ausencia de datos sobre la enfermedad en toda la provincia se planteó el estudio del reservorio canino, a través de encuestas epidemiológicas a los veterinarios y del estudio serológico prospectivo de los perros de la zona (ver Capítulo 3).

5.1 PRESENCIA DE LOS FLEBOTOMOS VECTORES DE LA LEISHMANIOSIS CANINA EN LA PROVINCIA DE LLEIDA Y EN ANDORRA. FACTORES QUE INFLUYEN EN SU DENSIDAD E IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA

Tanto en la provincia de Lleida como en Andorra, los estudios entomológicos llevados a cabo han permitido detectar la presencia de las dos especies vectoras de *Leishmania infantum* en España, *Phlebotomus ariasi* y *P. perniciosus*. En ambos territorios se habían llevado a cabo estudios previos al respecto, pero no con la misma exhaustividad y/o con la misma metodología de muestreo (Gállego y col., 1990; Lucientes y col., 2001). Ello ha permitido observar que ambas especies presentan una amplia distribución geográfica en la provincia de Lleida y, además, detectar por primera vez la presencia de *P. perniciosus* en Andorra, constatando nuestras sospechas ya que esta especie había sido capturada con anterioridad cerca del área limítrofe entre España y Andorra (Gállego y col., 1990). Los datos obtenidos en el presente estudio nos ofrecen una idea más realista sobre la densidad y distribución de *P. ariasi* y *P. perniciosus* en las áreas prospectadas.

En Lleida, ambas especies se han capturado en la práctica totalidad de la provincia y a un rango altitudinal muy variado (desde los 94 hasta los 1.630 m s.n.m.). En cambio, no ha sucedido igual en Andorra, donde *P. perniciosus* sólo se ha capturado en la zona fronteriza con España, por debajo de los 1.000 m s.n.m., mientras que en Lleida se ha encontrado hasta los 1.630 m s.n.m. En Lleida, la distribución altitudinal de *P. ariasi* alcanza los 1.620m mientras que en Andorra se distribuye a niveles altitudinales superiores, donde se ha capturado en una estación ubicada por encima de los 2.000 m s.n.m (2.141 m s.n.m). Este hecho es poco frecuente en las especies de flebotomos de la región mediterránea (Izri y col.,

2006), existiendo una única cita en Europa, concretamente en Calar Alto (Almería) (Martínez Ortega, 1985a).

En ambas áreas de estudio los resultados obtenidos concuerdan con la predominante presencia de *P. ariasi* en áreas húmedas o sub-húmedas con inviernos fríos y con la preferencia de *P. perniciosus* por zonas semiáridas o sub-húmedas con inviernos templados y veranos suaves (Aransay y col., 2004; Gállego y col., 1990; Gil Collado y col., 1989; Martínez Ortega, 1985a,b; Rioux, 2006; Rioux y col., 1967, 1986; Rispaíl y col., 2002). Así, no es de extrañar la escasa presencia de *P. perniciosus* en Andorra, por cuanto se trata de un país en el que predominan las montañas escarpadas por encima de los 800m s.n.m y con un clima Mediterráneo de alta montaña, mientras que la especie que presenta mayor densidad y está más ampliamente distribuida es *P. ariasi*. Una situación similar se da en los focos de leishmaniosis del sur de Francia, donde *P. ariasi* está presente fundamentalmente en la zona de los Pirineos Orientales, próxima a Andorra y, en cambio, *P. perniciosus* está presente mayoritariamente en los focos de la regiones de Marsella (Bouches-du-Rhône) y Niza (Alpes Maritimes) de la región de Provence-Alpes-Côte d'Azur (Izri y col., 1992; Marty y col., 2007; Rioux y col., 1969).

Diversos artículos tratan la influencia que ejercen la altitud, el bioclima y la vegetación, todos ellos estrechamente relacionados, sobre la densidad de especies vectoras de las leishmaniosis (Barón y col., 2011; Elnaiem y col., 1998; Ferreira y col., 2001; Gálvez y col., 2010a; Guernaoui y col., 2006; Ozbel y col., 2011; Rispaíl y col., 2002). Esta influencia ha sido detectada también por nosotros en la provincia de Lleida al realizar el análisis bivariante, donde, por primera vez, se ha podido constatar que estas variables se correlacionan con la densidad al tratar las especies vectoras que habitan en condiciones simpátricas, *P. ariasi* y *P. perniciosus*, de forma aislada. Sin embargo, estas variables se asocian de forma diferente según la especie vectora. Así, *P. ariasi* se captura preferentemente por encima de los 800 m s.n.m., en los bioclimas de la región medio-Europea y en presencia de pino de montaña y robles, mientras que *P. perniciosus* se capturó preferentemente por debajo de los 800 m s.n.m, en los bioclimas de la región mediterránea y en presencia de pino de Alepo y de garrigas.

Este comportamiento distinto ha sido puesto también de manifiesto cuando se analizan distintas variables climáticas relacionadas con la temperatura y la precipitación, Así, la densidad de *P. ariasi* correlaciona negativamente con la temperatura y positivamente con la precipitación, mientras que con *P. perniciosus* ocurre lo contrario. La influencia de la temperatura ha sido considerada por lo que respecta no solo a la biología y ecología de los

Discusión

flebotomos sino también en el desarrollo del parásito en el interior del vector (Elnaiem y col., 1998; Killick Kendrick, 1999; Maroli y col., 2008; Martín Sánchez y col., 2009; Ready, 2008; Ready y Croset, 1980; Rioux y col., 1969; Tarallo y col., 2010).

Los resultados obtenidos en el modelo final para la provincia de Lleida, nos han permitido observar que las variables que afectan de forma más significativa a la densidad de *P. perniciosus* están relacionadas con la cobertura del suelo y la situación de las trampas según fuera en zonas pavimentadas o no. En el caso de *P. ariasi*, la altitud y el bioclima son los factores más correlacionados con su densidad, lo que nos indica que sus requerimientos climatológicos están bien definidos, tal y como se ha podido observar en una área como la provincia de Lleida, de paisajes y condiciones meteorológicas tan cambiantes y que cubre un rango altitudinal muy amplio.

Los resultados obtenidos confieren información específica sobre los factores que influyen en la densidad de los vectores y están en concordancia con los requerimientos climáticos y ambientales inherentes a cada especie. El hecho de que *P. ariasi* y *P. perniciosus* mostraron correlaciones opuestas para algunas de las variables estudiadas refleja la importancia de su análisis individual.

La densidad de *P. ariasi* y *P. perniciosus* ha sido mucho más baja en Andorra que en Lleida, no alcanzando los valores sugeridos por varios autores en España y Francia para que tenga lugar la transmisión de la leishmaniosis, 4-6 flebotomos/m² (Martín-Sánchez y col., 2009; Rioux y col., 1977). En cambio, en Lleida se han alcanzado estas densidades, sobre todo en el caso de *P. perniciosus*. Teniendo en consideración otros estudios llevados a cabo en España, en que el potencial papel vectorial se ha asignado en función de la mayor abundancia y/o densidad de una de las especies vectoras en una zona (Martínez Ortega y col., 1985a,b), podríamos deducir que Lleida debe ser considerada como zona de riesgo para la transmisión de la leishmaniosis, siendo el vector potencial *P. perniciosus*, mientras que Andorra quedaría excluida de las zonas de riesgo de transmisión de la leishmaniosis. Sin embargo, hay 3 hechos que nos hacen rechazar este supuesto: 1) Por un lado, se ha demostrado el papel vectorial de *P. ariasi* y *P. perniciosus* actuando de forma simpátrica en un mismo foco (Pires, 1984; Lucientes y col., 1988; Rioux y col., 1986), 2) La abundancia y densidad de los flebotomos puede sufrir modificaciones debido al sesgo que se produce en función del método de muestreo (Gállego y col. 1992). Así, *P. ariasi* se captura fundamentalmente con trampas luminosas, debido a su fuerte fototropismo (Gállego y col. 1992; Portús y col., 2007) y 3) La heterogénea distribución del vector que favorece la presencia de áreas puntuales con

mayor o menor densidad. Por ello creemos que esta especie puede estar también involucrada en la transmisión de la leishmaniosis en Lleida y, de hecho, se ha demostrado la presencia de *L. infantum* en varios especímenes procedentes del Pallars Sobirà (Alcover y col., 2012), donde se detectó el primer caso de leishmaniosis canina. *P. perniciosus* podría actuar como el vector principal en el área del sur de Lleida, mientras que *P. ariasi* podría jugar este rol en el norte de la región Pirenaica.

La presencia del vector en un área está considerada como un factor de riesgo en la emergencia de la leishmaniosis en la Europa templada (Ready, 2008, 2010). En consecuencia, y teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado acerca de la densidad de los vectores, consideramos que Andorra debe ser incluida también entre las zonas de riesgo de presencia de la enfermedad. La temperatura estival en Andorra podría permitir el completo desarrollo del ciclo vital de los parásitos dentro de los vectores y ser transmitidos a los hospedadores vertebrados, como ha sido demostrado de forma experimental para *P. ariasi*, la especie con una distribución más amplia en Andorra (Rioux y col., 1967).

La transmisión de la leishmaniosis, tanto en Lleida como en Andorra, tendría lugar preferentemente en zonas alejadas de ambientes domésticos y localizadas en zonas rurales de bosques y cultivos, ya que en ellas se encuentra de forma significativa una mayor densidad de ambas especies vectoras en la provincia de Lleida.

En ambas áreas quedarían por realizar diversos estudios relacionados con los requisitos que debe cumplir una especie de flebotomo para ser considerada como vector de la leishmaniosis existente en la zona (Killick-Kendrick, 1990; Maroli y col., 2012; WHO 2010): 1) El vector debe alimentarse de los humanos y del reservorio en las leishmaniosis de tipo zoonótico, 2) el vector debe estar infectado con la misma especie y cepa de *Leishmania* que los humanos y el reservorio, 3) el vector debe ser susceptible de que se desarrolle el ciclo del parásito en su interior después de producirse la digestión de la sangre infectada, y 4) El vector debe ser capaz de transmitir el parásito por picadura a un hospedador susceptible cuando pica para alimentarse. De forma más rápida se podrían realizar estudios acerca de la ingesta sanguínea de los flebotomos y del parasitismo e identificación de las cepas aisladas a partir del vector. Tan sólo en unos pocos ejemplares hemos podido verificar el papel vectorial de *P. ariasi* en el Pallars Sobirà (Alcover y col., 2012)

La epidemiología de la leishmaniosis depende de las características del parásito, de las características ecológicas del lugar de transmisión, de la actual y pasada exposición de la población humana al parásito y del variado comportamiento humano. Cambios en el

ambiente, como la deforestación, la domesticación del ciclo de transmisión, la incursión de granjas y poblaciones en áreas de bosque, el tratamiento de los cultivos con insecticidas, etc., tienen una gran influencia en la epidemiología de la enfermedad (Desjeux, 2001; Gállego, 2004; Maroli y col., 2012; Morillas Márquez, 2010). Se ha sugerido que la distribución y las fronteras de la enfermedad van a verse afectados por el cambio global, favoreciendo o no su expansión, emergencia y/o re-emergencia (Kovats y col., 2001; Maroli y col., 2012; Rispaill y col., 2002; Semenza y Menne, 2009; Sutherst, 2004; WHO, 2010). Un monitoreo constante de los flebotomos vectores en los nuevos focos de leishmaniosis es crucial para evaluar la expansión geográfica de la enfermedad. Por ello, puede ser de interés en el futuro comparar los resultados obtenidos en relación al cambio climático y la hipótesis de la propagación de *P. perniciosus* hacia áreas del norte donde se adquieran temperaturas estivales más tolerables mientras que esta especie podría descender en regiones del sur (Kuhn, 1999) o con el incremento del periodo de actividad y la competencia vectorial de *P. ariasi* en áreas del norte. Resultados de este tipo se han encontrado en áreas del centro y sur de España (Gálvez y col., 2010a; Martín Sánchez y col., 2009).

5.2 PRESENCIA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA EN LA PROVINCIA DE LLEIDA. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA

La provincia de Lleida ocupa una extensión de 12.173 Km² y se calcula que existe una población canina de 9.342 perros de raza (datos registrados en el Libro de Origen Español y en el Registro de Razas Caninas de la Real Sociedad Canina de España a finales del 2004). La estimación de la población canina real debería estar muy incrementada dado que muchos de los perros son cruzados y, en muchas ocasiones, no están censados, sobre todo en zona rural. Estos hechos hacían muy difícil efectuar un estudio sero-epidemiológico transversal de la población canina, método habitualmente utilizado en los estudios epidemiológicos existentes hasta la fecha, realizado, por otro lado, en áreas más limitadas (Acedo-Sánchez y col., 1996; Alonso y col., 2010; Fisa y col., 1999; Gálvez y col., 2010b; Martínez-Cruz y col., 1990; Morales-Yuste y col., 2011; Nieto y col., 1999). La realización de estudios serológicos es imprescindible dado que el diagnóstico clínico de la enfermedad es difícil, dada la variedad e inespecificidad de los signos clínicos (Alvar, 2004; Baneth y col., 2008; Gállego, 2004; Gradoni, 2002; Solano Gallego y col., 2009), así como la existencia de un grupo importante de animales asintomáticos (Alvar, 2004; Baneth y col., 2008; Fisa y col., 1999; Solano Gallego y col., 2009). Por otro lado, se añadió la dificultad de la recolecta de sangre que, en

estudios previos, se veía favorecida al reunir a todos los perros de una localidad aprovechando las campañas de vacunación antirrábica, inexistentes en la actualidad. Esto hacía imprescindible contar con la ayuda de los veterinarios locales para buscar a los perros y alentar a los dueños a participar en este tipo de estudios.

Es por ello que se decidió aplicar un cuestionario sobre la enfermedad a los veterinarios de la provincia dedicados a los pequeños animales y realizar el estudio seroepidemiológico en un área reducida y con población canina ubicada de forma favorable para entrar en contacto con el vector y padecer la enfermedad.

Lleida es principalmente una región agricultora y ganadera donde muchos veterinarios se dedican principalmente al cuidado y control de grandes animales, por lo tanto, el número de cuestionarios enviados no fue muy elevado (41). Aun así, la respuesta fue considerablemente mayor (78%) que en otros estudios europeos donde se ha utilizado esta metodología (Farkas y col., 2011; Gálvez y col., 2011b; Ruiz de Ybáñez y col., 2009) y similar a un estudio llevado a cabo en Italia (Morosetti y col., 2009). Esta gran participación podría estar relacionada con la opinión generalizada de los veterinarios de que la expansión de la leishmaniosis canina había incrementado durante los diez años previos a la realización de la encuesta. Así, la totalidad de los veterinarios opinaba que al menos alguno de los casos de leishmaniosis canina eran nuevos y autóctonos (93,8%), lo que jugaba a favor de la existencia de la leishmaniosis canina y, además, autóctona en la provincia.

El estudio seroepidemiológico de la leishmaniosis canina se llevó a cabo en la comarca del Pallars Sobirà, dado que se había detectado un animal positivo que no había salido del área. Un gran porcentaje de los perros analizados eran cazadores que convivían en perreras en un ambiente rural. Este tipo de perros han sido considerados como indicadores centinelas de enfermedades de interés veterinario (Cabezón y col., 2010).

Las aproximaciones diagnósticas más utilizadas en el estudio de perros infectados incluyen técnicas serológicas y moleculares (Solano-Gallego y col., 2009). Dado que las técnicas serológicas muestran diferentes grados de sensibilidad y especificidad, que pueden influir en la seropositividad de la leishmaniosis canina en un área (Aisa y col., 1998; Iniesta y col., 2002; Riera y col., 1999), decidimos combinar varias técnicas y considerar como seropositivos e infectado aquellos perros que resultaron positivos para al menos dos de las técnicas inmunológicas, de acuerdo con Iniesta y col. (2002).

Discusión

La seroprevalencia reportada en este estudio (33%), en una área donde la presencia de la enfermedad era desconocida, es elevada considerando que la mayor seroprevalencia encontrada en un foco conocido de España es de 34,6% (Morillas y col., 1996). No obstante, nuestro hallazgo puede ser considerado una sobrestimación debido a la naturaleza sesgada de la muestra. Los perros analizados (94,4% de ambiente rural o periurbano y 80,7 % en perreras) vivían en el exterior en óptimas condiciones para la transmisión de la enfermedad tal como ha sido mencionado (Amusatogui y col., 2004; Gálvez y col., 2010b; Fisa y col., 1999; Martín-Sánchez y col., 2009; Morales-Yuste y col., 2011), debido al carácter exofílico y exofágico de la mayoría de especies que se alimentan de sangre al caer el sol o durante la noche (Killick-Kendrick, 1999). Por otro lado, la densidad de los perros que conviven en perreras es otro factor que facilita la transmisión del parásito, tanto directamente como a través del vector (Riera y Valladares, 1996; Solano-Gallego y col., 2009).

El riesgo de seropositividad en los perros incrementaba con la edad, hecho lógico al aumentar el riesgo de exposición a la picada de los flebotomos (Abranches y col., 1991). La localización del perro en área rural y en la región sur de la comarca ha sido otro factor asociado a una mayor prevalencia de la enfermedad. La mayor prevalencia de la leishmaniosis canina en zona rural concuerda con la mayor densidad de flebotomos en esta zona, lo cual es lógico al considerar que así se incrementa la posibilidad del contacto entre el vector y el hospedador. No ocurre lo mismo al considerar las zonas norte y sur de la provincia donde la densidad de los vectores ha resultado ser similar. Diversos factores pueden explicar la ausencia de relación entre la densidad de los vectores y la prevalencia de la leishmaniosis canina en ambas áreas. Por un lado, sesgos introducidos en el muestreo, tanto de los vectores como del reservorio. Por otro lado las distintas condiciones climáticas, fundamentalmente de temperatura, en que se desarrollará el ciclo biológico del parásito en el interior del vector en una u otra zona. La temperatura influiría no solamente en la capacidad vectorial, tal y como ha sido demostrado experimentalmente (Rioux y col., 1985), sino también en el periodo de actividad y comportamiento fenológico de los vectores.

Dos variables relacionadas con los dueños fueron encontradas como factores de riesgo para la infección en perros. Una fue la percepción sobre el riesgo de que sus perros contrajeran la leishmaniosis canina a lo largo de su vida en que, lógicamente, se observó que los animales enfermos pertenecían en un mayor porcentaje a los dueños que opinaban que sus perros podían enfermar (OR: 1.26). La segunda fue la ignorancia sobre las medidas profilácticas para proteger a sus perros de la picada de los flebotomos (OR: 11.6), hecho que implica una

elevada posibilidad de que sus perros experimenten picadas de flebotomos y, consecuentemente, sean infectados. Al fin y al cabo, parece lógico pensar que el comportamiento de los amos respecto a los animales influya de manera considerable en la transmisión de la enfermedad. En áreas rurales muchos dueños no llevan a sus perros al veterinario de forma rutinaria, especialmente si sus animales no están enfermos, de modo que no se exponen a las recomendaciones sobre el uso de medidas preventivas mencionadas por los veterinarios en el cuestionario. No obstante, encontramos que un 42% de los perros analizados usaban medidas preventivas, concretamente collares impregnados de insecticida, que resultan efectivos contra las picadas de flebotomos (Molina y col., 2001) si son utilizados de forma correcta.

La información obtenida en los cuestionarios veterinarios nos demuestra que éste es un método de ejecución simple, factible y poco costoso que puede ayudar de forma rápida a definir el conocimiento, percepción y conciencia de la enfermedad en una región no estudiada. Además, en nuestro caso, los resultados del cuestionario apoyaban la hipótesis de la existencia de un foco autóctono de leishmaniosis canina en la provincia debido al hallazgo de un primer caso de leishmaniosis positivo en la comarca pirenaica del Pallars Sobirà donde, finalmente y como se ha comentado, se llevó a cabo un estudio transversal sobre la enfermedad en la población canina.

La utilidad de los estudios de la leishmaniosis canina en perreras ha sido discutida (Baldelli y col., 2011; Cabezón y col., 2010; Miró y col., 2012), principalmente en referencia a perreras que recogen perros callejeros y/o abandonados sin datos sobre su origen. Sin embargo, a diferencia de otros estudios, en nuestro estudio las perreras eran privadas y la mayoría de los perros eran locales y tenían cartillas de identificación, lo que nos ha permitido detectar la existencia de un foco de leishmaniosis autóctona en una comarca de la provincia de Lleida.

El simple hecho de encontrar animales infectados en áreas clásicamente consideradas libres de leishmaniosis ha llevado a algunos autores a considerar que la enfermedad está emergiendo en un área geográfica determinada y que ésta es endémica. Sin embargo estas aseveraciones se hacen sin tener en cuenta que se cumplan las premisas necesarias para considerar la enfermedad como emergente y un foco como endémico. Así, en nuestro caso, “a priori”, consideraríamos la leishmaniosis canina emergente y endémica en la provincia de Lleida, más concretamente en la comarca del Pallars Sobirà.

Sin embargo, hemos encontrado un elevado porcentaje de perros asintomáticos seropositivos (70%), como ocurre en otras áreas endémicas que funcionan desde hace años (Fisa y col.,

1999; Gálvez y col., 2010b). Por otro lado, una seroprevalencia de la leishmaniosis canina superior al 2,5% se ha asociado a la existencia de focos estables de la enfermedad (Rioux y col., 1971). Por todo ello, suponemos que la presencia de la leishmaniosis canina en la comarca del Pallars Sobirà no es muy reciente y que, por lo tanto, la detección del foco no sería debida a la emergencia de la enfermedad en la zona. Los resultados obtenidos en el presente trabajo cumplen con los criterios establecidos por Maroli y col. (2008) a la hora de definir un foco endémico indiscutible de leishmaniosis: i) la confirmación de uno o más casos de leishmaniosis canina, la mayoría por métodos serológicos y en un caso mediante el aislamiento del parásito, ii) la presencia de perros positivos entre aquellos asintomáticos, iii) dos especies vectoras presentes en el área de estudio. A ello añadimos que *L. infantum* ha sido encontrada en flebotomos de la región (Alcover y col., 2012).

En los focos mediterráneos de *L. infantum*, los perros son considerados el reservorio principal para la leishmaniosis humana (Gállego, 2004; Ready, 2010). La importancia del perro como reservorio de la leishmaniosis viene dada por el hecho de que garantiza la existencia y supervivencia del agente etiológico y es la fuente de infección para el humano (WHO, 2010). Este hecho se favorece tanto por el carácter crónico con que cursa la enfermedad en la población canina (Gállego, 2004) como por el tropismo de los flebotomos (de Colmenares y col., 1995; Guy y col., 1984; Rossi y col., 2008). Sin embargo, para que un animal pueda ser considerado como reservorio debe cumplir varias condiciones, entre las que cabe destacar el hecho de que debe compartir las mismas cepas que las aisladas del hospedador humano (Killick-Kendrick, 1990; Maroli y col., 2012). En nuestro caso, sólo hemos podido aislar una cepa del perro, perteneciente al zimodema MON-1, uno de los principales responsables de la leishmaniosis visceral humana y el zimodema más frecuentemente aislado en el perro (Gállego y col., 2001).

Por lo tanto, se ha podido cerrar el ciclo epidemiológico de la leishmaniosis en el Pirineo leridano ya que se ha identificado a *Leishmania infantum* en el perro y en varios *P. ariasi* capturados en el lugar donde se aisló la cepa canina. Sin embargo aún quedan lagunas o aspectos que merecen la pena ser estudiados. Entre otros, la obtención de datos más fidedignos acerca de la prevalencia de la leishmaniosis canina en la comarca del Pallars Sobirà, extensible a toda la provincia de Lleida, realizados en una muestra más representativa de la población canina. Por otro lado, comprobar cómo podrían influir los cambios ambientales y climáticos en el incremento y nueva distribución de flebotomos vectores, tal y como ha sido propuestos por diversos autores (Colwell y col., 2011; Desjeux, 2001; Ferroglio

y col., 2005; Morosetti y col., 2009; Ready, 2008). La existencia de datos exhaustivos acerca de la presencia y densidad de los flebotomos vectores en la práctica totalidad de la provincia de Lleida permitirá la implementación de estos estudios en un futuro.

Los resultados entomológicos de Andorra aconsejan la obtención de datos sobre la presencia de la leishmaniosis humana y canina en este país. La vigilancia de perros traídos de otras áreas endémicas sería aconsejable con tal de evitar o controlar el posible establecimiento de la enfermedad en Andorra.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONS

A. Sand flies

A.1. In Andorra

1. The first record of *Phlebotomus perniciosus* in Andorra increases the number of sand fly species in this country to three: *P. perniciosus*, *P. ariasi* and *Sergentomyia minuta*, the last not being found in the present study.
2. *P. ariasi* has a greater density (d: 0.47 specimens/m²) and a larger geographical distribution, from 869 up to 2,141 m above the sea level (m a.s.l.), than *P. perniciosus* (d: 0.08 specimens/m²), which is present only in the south and at altitudes below 1,000 m a.s.l.
3. Andorra is an area at risk of human and canine leishmaniasis emergence, given the presence of vectors during the disease transmission period in temperate countries.

A.2. In Lleida province:

1. The presence of five sand fly species in Lleida province has been confirmed, captured in the following order of decreasing density: *Sergentomyia minuta* (d: 32.5 specimens/m²), *Phlebotomus perniciosus* (d: 4.5 specimens/m²), *P. ariasi* (d: 1 specimen/m²), *P. papatasi* (d: 0.8 specimens/m²) and *P. sergenti* (d: 0.2 specimens/m²).
2. The two vector species of *Leishmania infantum*, *P. perniciosus* and *P. ariasi*, have a wide but different geographical distribution: *P. perniciosus* was not captured in the counties of Pla d'Urgell and Vall d'Aran, while *P. ariasi* was absent in the southwest counties (Segrià, Pla d'Urgell and Garrigues).
3. The bivariate analysis revealed that factors such as altitude, bioclimatic zone, temperature, precipitation, sampling site (site relative to settlement, site situation, site category), vegetation in the wall, the fact of being in a natural park, general environment, adjacent natural vegetation and land cover were significantly associated with sand fly densities, sometimes in opposite ways, according to the vector species.

Conclusiones

4. The multivariate model for *P. perniciosus* revealed that its density was affected by the site situation and land cover of the sampling site. In the case of *P. ariasi*, a significant correlation was observed with the altitude and bioclimatic zone.
5. Given the influence of biotic and abiotic factors in the distribution and density of vector species, it is clear that global change would affect the distribution and expansion of leishmaniasis in Lleida province.

B. Canine leishmaniasis in Lleida province

1. The results of a questionnaire survey on canine leishmaniasis carried out among veterinarians in Lleida province suggested the existence of an autochthonous focus of the disease in the province, which was subsequently confirmed by a serological cross-sectional study of the canine population in Pallars Sobirà county.
2. The seroprevalence of canine leishmaniasis in a biased population, composed of hunting dogs living in kennels in a rural environment in Pallars Sobirà county, was high: 33%.
3. The risk of seropositivity in dogs increased in the south of the county, with the age of the animals and in dogs whose owners believed their animals were at risk of developing the disease and were unaware of preventative measures against sand flies bites. On the other hand, the risk decreased in dogs living in an urban and peri-urban environment.
4. The high seroprevalence of canine leishmaniasis detected and the high percentage of asymptomatic seropositive animals suggest that the focus detected for the first time in Lleida province has not emerged recently.
5. The usefulness of veterinary questionnaires in defining awareness of canine leishmaniasis in a naïve region has been confirmed. This kind of methodology is quick, cheap and feasible.
6. The usefulness of studying a local dog population living in kennels to detect an autochthonous leishmaniasis focus has been demonstrated, despite the low number of animals involved.
7. *Leishmania infantum* transmission could be favoured by the presence of a high density of dogs living under conditions suitable for the transmission of the disease, even in the presence of a low density of sand flies vectors captured with sticky traps.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abonnenc E, Pastre J. Capture of *Phlebotomus* in the Republic of South Africa, with a description of *P. macintoshi*, n. sp. (Diptera, Psychodidae). Bull Soc Pathol Exot Filiales 1972; 65:721-725.
- Abranches P, Conceição Silva FM, Ribeiro MM, Lopes FJ, Gomes LT. Kala-azar in Portugal- IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983; 77:420-421.
- Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. J Parasitol 1991; 77:557-561.
- Acedo-Sánchez C, Martín Sánchez J, Vélez Bernal ID, Sanchís Marín MC, Louassini M, Maldonado JA, Morillas Márquez F. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain). Int J Parasitol 1996; 26:303-310.
- Acedo-Sánchez C, Morillas-Márquez F, Sanchíz-Marín MC, Martín-Sánchez J. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. Vet Parasitol 1998; 75:1-8.
- Agut A, Corzo N, Murciano J, Laredo FG, Soler M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. Vet Rec 2003; 153:648-652.
- Aisa MJ, Castillejo S, Gállego M, Fisa R, Riera MC, de Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, Portus M. Diagnostic potential of Western Blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. Ann J Trop Med Hyg 1998; 58:154-159.
- Alcaraz F. Pisos bioclimáticos y pisos de vegetación. Geobotánica. Tema 7. 2011. http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/deed.es_CL
- Alcover MM, Gramiccia M, di Muccio T, Ballart C, Castillejo S, Picado A, Portús M, Gállego M. Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis. Parasitol. Res. 2012; 111:515-523.
- Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol 2000; 14:109-122.
- Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol 2003; 17:1-18.

Bibliografía

- Alexandre-Pires G, Pais D, Correia M, Pina JA. Leishmaniosis. A report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Micros Res Tech* 2006; 69:227-35.
- Alonso F, Giménez Font P, Manchón M, Ruiz de Ybáñez R, Segovia M, Berriatua E. Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean area. *Zoonoses Public Health* 2010; 57:318-328.
- Alvar Ezquerro JP. Las Leishmaniasis: de la biología al control. 2ª edición. Laboratorios Intervet S.A. Madrid 2001; 200 pp.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:334-359.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:298-319.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004; 57:1-88.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7:e35671.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006; 22:552-557.
- Amóra SS, Bevilaqua CM, Feijó FM, D Alves N, do V Maciel M. Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotrop Entomol* 2009; 38:303-310
- Amusatogui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro MA. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in Northwestern Spain, an Area Traditionally Considered Free of Leishmaniasis. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1026:154-157.
- Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:109-118.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y, Ready PD. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. *Insect Mol Biol* 2000; 9:157-168.
- Aransay AM, Testa JM, Morillas-Márquez F, Lucientes J, Ready PD. Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol Res* 2004; 94:416-420.

- Arias J. Datos para el conocimiento de la distribución geográfica de los Dípteros de España. Mem R Soc Española de Historia Natural 1911; 7:61-246.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000; 30:1269-1281.
- Aspöck H, Gerersdorfer, T, Formayer, H, Walochnik J. Sand flies and sand fly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. Wien Klin Wochenschr 2008; 120:24-29.
- Azizi K, Moemenbellah-Fard MD, Fakoorziba MR, Fekri S. *Gerbillus nanus* (Rodentia: Muridae): a new reservoir host of *Leishmania major*. Ann Trop Med Parasitol 2011; 105:431-437.
- Baldelli R, Piva S, Salvatore D, Parigi M, Melloni O, Tamba M, Bellini R, Poglayen G. Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel. Vet Parasitol 2011; 179:57-61.
- Ballart C, Alcover MM, Picado A, Nieto J, Castillejo S, Portús M, Gállego M. First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study. Pre Vet Med 2012a; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.003>
- Ballart C, Alcover MM, Portús M, Gállego M. Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain. Trans R Soc Trop Med Hyg 2012b; 106:134-136.
- Ballart C, Barón S, Alcover MM, Portús M, Gállego M. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. Acta Trop 2012c; 122:155-159.
- Baneth G, Dank G, Keren-Kornblatt E, Sekeles E, Adini I, Eisenberger CL, Schnur LF, King R, Jaffe CL. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. Am J Trop Med Hyg 1998; 59:722-725.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol 2008; 24:324-330.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol 2007; 64:1-109.
- Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. Parasite Immunol 2006; 28:329-337.
- Barón S, Martín-Sánchez J, Gállego M, Morales-Yuste M, Boussaa S, Morillas-Márquez F. Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. Acta Trop 2008; 107:259-267.

Bibliografía

- Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Irigaray C, Martín-Sánchez J. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* 2011; 138:1234-1244.
- Barrio A, Parodi CM, Locatelli F, Mora MC, Basombrío MA, Korenaga M, Hashiguchi Y, García Bustos MF, Gentile A, Marco JD. *Leishmania infantum* and human visceral leishmaniasis, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:354-355.
- Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 2007; 37:1097-1106.
- Batista LF, Segatto M, Guedes CE, Sousa RS, Rodrigues CA, Brazuna JC, Silva JS, Santos SO, Larangeira D, Macedo AM, Schriefer A, Veras PS. An assessment of the genetic diversity of *Leishmania infantum* isolates from infected dogs in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86:799-806.
- Benabdennbi I, Pesson B, Cadi Soussi M, Morillas Márquez F. Morphological and isoenzymatic differentiation of sympatric populations of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in northern Morocco. *J Med Entom* 1999; 36:116-120.
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55:273-277.
- Beugnet F, Marié JL. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe *Vet Parasitol* 2009; 163:298-305.
- Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A, Romano A, Ferroglio E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont Region) where such infections are traditionally nonendemic. *J Clin Microbiol* 2010; 48:131-136.
- Bogdan C, Schönian G, Bañuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, Röllinghoff M, Mertens R. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32:302-306.
- Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 12:e1019.
- Botet Fregola J, Portús Vinyeta M. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). *Rev San Hig Púb* 1993; 67:225-266.

- Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhls K, Schönian G, Dujardin JC. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol* 2006; 6:440-446.
- Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A. Natural infection of North African gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86:962-965.
- Brooks D, Hoberg E. How will global climate change affect parasite-host assemblages? *Trends in Parasitology* 2007; 23:571-573.
- Cabezón O, Millán J, Gomis M, Dubey JP, Ferroglio E, Almería S. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. *Parásitol Res* 2010; 107:1505-1508.
- Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux JA, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, Cortes S, Ramada J, Cristovão JM, Afonso MO, Dedet JP. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health* 2006; 11:1708-1714.
- Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Rossi L, Ruggiero M. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. *Parassitologia* 2004; 46:193-197.
- Carreira JC, da Silva AV, de Pita Pereira D, Brazil RP. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasit Vectors* 2012; 5:111.
- Carrió J, Portús M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol* 2002; 2:2-11.
- Chamaillé L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P, Dedet JP. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasit Vectors* 2010; 8:3-31.
- Chitimia L, Muñoz-García CI, Sánchez-Velasco D, Lizana V, Del Río L, Murcia L, Fisa R, Riera C, Giménez-Font P, Jiménez-Montalbán P, Martínez-Ramírez A, Meseguer-Meseguer JM, García-Bacete I, Sánchez-Isarria MA, Sanchis-Monsonís G, García-Martínez JD, Vicente V, Segovia M, Berriatua E. Cryptic leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet Parasitol* 2011; 181:12-16.
- Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L, Persechino A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J* 2005; 169:465-467.

Bibliografía

- Claborn DM. The biology and control of leishmaniasis vectors. *J Glob Infect Dis* 2010; 2:127-34.
- Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. Detection of *Leishmania infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res* 2011; 109:267-274.
- Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol* 2011; 182:14-21.
- Conesa Gallego E, Romera Lozano E, Martínez Ortega E. Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la comunidad de Madrid (España). Servicio de publicaciones - Universidad de Murcia. *Anales de Biología* 1999; 22:43-50.
- Copeland HW, Arana BA, Navin TR. Comparison of active and passive case detection of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43:257-259.
- Costa CH, Tapety CM, Werneck GL. Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:415-419.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002; 186:1314-1320.
- Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2005; 128:149-155.
- Coutinho MT, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol* 2007; 147:320-325.
- Criado-Fornelio A, Gutierrez-Garcia L, Rodriguez-Cabeiro F, Reus-Garcia E, Roldan-Soriano MA, Diaz-Sanchez MA. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol* 2000; 92:245-251.
- Croft AM, Taylor NA, Rodenhurst KE. Sandflies and leishmaniasis. *Lancet* 2006; 367:112.
- Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*. 2002 Mar 30;359(9312):1124-5.
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 2006; 123:357-388.
- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149:139-146.

- Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandão-Filho SP, Alves LC, Otranto D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. Parasitol Res 2010; 106:857-860.
- Day MJ. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. Parasit Vectors 2011; 13:4-49.
- de Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6:1596.
- de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98:861-870.
- de Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Aisa MJ, Wolff M, Seguí MG. Identification of Blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Biotin/Avidin Method. J Med Entomol 1995; 32:229-233.
- de Lima H, Rodríguez N, Feliciangeli MD, Barrios MA, Sosa A, Agrela I, Sánchez E, Lopez O. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania chagasi/L. infantum* in an endemic area of Guarico State, Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg 2009; 103:721-726.
- de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. *Transmission of Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. Vet Parasitol 2006; 137:159-167.
- den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. Clin Microbiol Infect 2011; 17:1471-1477. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03635.x.
- Dedet JP, Pratlong F. Manson's Tropical Diseases. 21ª edición. En: Leishmaniasis. Sección 10. Capítulo 75. Cook y Zumla. Sanders 2003; 1339-1364.
- Depaquit J, Ferte H, Léger N, Killick-Kendrick R, Rioux JA, Killick-Kendrick M, Hanafi HA, Gobert S. Molecular systematics of the phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation. Insect Mol Biol 2000; 9:293-300.
- Depaquit J, Léger N, Killick-Kendrick R. Description de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *riouxi* n.sp. (Diptera - Psychodidae) d'Afrique du Nord. Parasite 1998; 5:151-158.
- Desjeux P. Leishmaniasis. Public Health Aspects and Control. Clin Dermatol 1996; 14:417-423.

Bibliografia

- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:239-243.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Inf Dis* 2004; 27:302-318.
- Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97:3-15.
- Dereure J, Pratlong F, Dedet JP. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. En: *Canine Leishmaniasis: an update. Proc International Canine Leishmaniasis Forum. Hoechst Roussel Vet. Barcelona, Spain 1999; 18-25.*
- Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martínez S, Pratlong F, Balard Y, Dedet JP. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector-borne Zoonotic Dis* 2009; 9:687-694.
- di Muccio T, Marinucci M, Frusteri L, Maroli M, Pesson B, Gramiccia M. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larrossius* (Diptera: Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect Bioc Mol Biol* 2000; 30:387-393.
- Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis* 1997; 25:1240-1242.
- Dolmatova AV, Demina NA. Les phlébotomes et les maladies qu'ils transmettent. Éditions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer (ORSTOM) 1971; 168 pp.
- Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbel Y, Boelaert M. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1013-1018.
- Dujardin JP, Le Pont F, Martínez E. Quantitative phenetics and taxonomy of some phlebotomine taxa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:735-741.
- Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:440-446.
- Elnaiem DA, Connor SJ, Thomson MC, Hassan MM, Hassan HK, Aboud MA, Ashford RW. Environmental determinants of the distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92:877-887.

- Esseghir S, Ready PD, Ben Ismail R. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larrossius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. *Biol J Linnean Society* 2000; 70:189-219.
- Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2010; 2:248-257.
- Farkas R, Tánzos B, Bongiorno G, Maroli M, Dereure J, Ready PD. First Surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:823-834.
- Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Bardagí M, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol* 2006; 135:181-185.
- Ferreira AL, Sessa PA, Varejão JB, Falqueto A. Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in an endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96:1061-1067.
- Ferroglia E, Maroli M, Gastaldo S, Mignone W, Rossi L. Canine leishmaniasis, Italy. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1618-1620.
- Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego M, Portús M. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 1999; 83:87-97.
- Franco AO, Davies CR, Mylne A, Dedet JP, Gállego M, Ballart C, Gramiccia M, Gradoni L, Molina R, Gálvez R, Morillas-Márquez F, Barón-López S, Alves Pires C, Afonso MO, Ready PD, Cox J. Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology* 2011; 138:1878-1891.
- França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 111:161-173.
- Galati E.A.B. Classificação de Phlebotominae. In *Flebotomíneos do Brasil* (EF Rangel & R Lainson, eds.). Editora Fiocruz, Rio de Janeiro 2003; 23-52pp.
- Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2004; 23:661-676.
- Gállego Berenguer J. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 2ª edición. Universitat de Barcelona. En: Capítulo 11.3 Mastigoforos hemotisulares. Orden kinetoplastida. 2003; 148-165.

Bibliografía

- Gállego Berenguer J, Botet J, Gállego M, Portús M. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. En: *In Memoriam* al Prof. Dr. D.F. de P. Martínez Gómez. S. Hernández (Ed.). Publicaciones de la Universidad de Córdoba 1992; 581-600.
- Gállego Culleré M. Los flebotomos vectores de la leishmaniosis canina. Consideraciones generales. *Canis et felis* 1997; 29:21:31.
- Gállego M, Pratlong F, Fisa R, Riera C, Rioux JA, Dedet JP, Portús M. The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:269-271.
- Gállego M, Rioux JA, Rispail P, Guilvard E, Gállego J, Portús M, Delalbre A, Bastien P, Martínez-Ortega E, Fisa R, Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Rev Ibér Parasitol* 1990; 50:123-127.
- Gálvez R, Descalzo MA, Guerrero I, Miró G, Molina R. 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* 2011a; 11:799-806.
- Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, Martín O, Dos Santos-Brandao F, Guerrero I, Cubero E, Molina R. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop* 2010a; 115:95-102.
- Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Molina R. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Prev Vet Med* 2011b; 102:59-65.
- Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasito.* 2010b; 169:327-334.
- Gavvani AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebbali M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Ann J Trop Med Hyg* 2002; 67:511-515.
- Gil Collado J. Phlébotomes et leishmanioses en Espagne. *Colloques Internationaux du CNRS* 1977; 239:177-190.

- Gil Collado J, Morillas F, Sanchís MC. Los flebotomos en España. Revista de Sanidad e Higiene Pública 1989; 63:15-34.
- Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain 2002; 7-14.
- Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. Vet Parasitol 2011; 181:23-30.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol 2005; 35:1169-1180.
- Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, le Blancq S, Evans DA, Peters W, Bettini S, Gradoni L, Pozio E. Enzymatic typing of 11 strains of *Leishmania* isolated in mainland Italy from the visceral murine, canine and vulpine forms. Demonstration of an enzymatic variant in the fox (*Vulpes vulpes*) and the dog. Ann Parasitol Hum Comp 1982; 57:527-531.
- González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, Sánchez-Cordero V, Sarkar S. Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4:e585.
- Gothe R, Nolte I, Kraft W. Leishmaniasis in dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternatives to conventional causal therapy. Tierarztl Prax 1997; 25:68-73.
- Grevot A, Jaussaud Hugues P, Marty P, Pratlong F, Ozon C, Haas P, Breton C, Bourdoiseau G. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. Parasite. 2005; 12:271-275.
- Guernaoui S, Boumezzough A, Laamrani A. Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to the risk of leishmaniasis transmission. Acta Trop 2006; 97:346-351.
- Guilvard E, Gállego M, Moreno G, Fisa R, Rispaill P, Pratlong F, Martínez-Ortega E, Gállego J, Rioux JA. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera-Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne). Parasite 1996; 3:191-192.
- Guy MW, Killick-Kendrick R, Gill GS, Rioux JA, et al. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses. Ann Parasitol Hum Comp 1984; 59:449-458.
- Hamadto HA, Al FA, Farrag AB, Abdel Maksoud MK, Morsy TA. Zoonotic cutaneous leishmaniasis: reservoir host and insect vector in north Sinai, Egypt. J Egypt Soc Parasitol 2007; 37:843-850.

Bibliografia

- Hatermink N, Vanwambeke SO, Heesterbeek H, Rogers D, Morley D, Pesson B, Davies C, Mahamdallie S, Ready P. Integrated mapping of establishment risk for emerging vector-borne infections: a case study of canine leishmaniasis in southwest France. *PloS One* 2011; 6:e20817.
- Humberg RM, Oshiro ET, Cruz Mdo S, Ribolla PE, Alonso DP, Ferreira AM, Bonamigo RA, Tasso N Jr, de Oliveira AG. *Leishmania chagasi* in Opossums (*Didelphis albiventris*) in an Urban Area Endemic for Visceral Leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87:470-472.
- Iniesta L, Fernández-Barredo S, Bulle B, Gómez MT, Piarroux R, Gállego M, Alunda JM, Portús M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:1137-1141.
- Iniesta L, Gállego M, Portús M. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 119:189-197.
- Izri MA, Marty P, Rahal A, Lelievre A, Ozon C, Baldelli G, Presiozo J, Haas P, Le Fichoux Y. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 naturellement infesté par des promastigotes dans la région de Nice (France). *Bull Soc Pathol Exot* 1992; 85:385-387.
- Izri A, Depaquit J, Parola P. Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du Bassin Méditerranéen. *Med Trop* 2006; 66:429-435.
- Jacob D. Short communication on regional climate change scenarios and their possible use for impact studies on vector-borne diseases. *Parasitol Res* 2008; 103:3-6.
- Jarvis A, Reuter HI, Nelson A, Guevara E. Hole-filled seamless SRTM data V4, International Centre for Tropical Agriculture (CIAT) 2008; <http://srtm.csi.cgiar.org>.
- Jüttner C, Rodríguez Sánchez M, Rollán Landeras E, Slappendel RJ, Fragío Arnold C. Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Vet Rec* 2001; 149:176-179.
- Kedzierski L. Leishmaniasis. *Hum Vaccin* 2011; 7:1204-1214.
- Khun KG. Global warming and leishmaniasis in Italy. *Trop Med Int Health* 1999; 7:1-2.
- Killick-Kendrick R. Investigation of phlebotomine sandflies. Indo-UK Workshop on leishmaniasis. Patna, India 1983; 72-83.
- Killick-Kendrick R. Biology and epidemiology. The leishmaniasis in biology and medicine I. Peters W, Killick-Kendrick R ed. London Academic Press 1987; 550pp.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4:1-24.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 1999; 17:279-289.

- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 1997; 11:105-111.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pinelli E, Del Real G, Molina R, Vitutia MM, Cañavate MC, Nieto J. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* 1994; 1:311-318.
- Killick-Kendrick R, Rioux JA. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia* 2002; 44:67-71.
- Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr Med Chem* 2012; 19:1443-1474.
- Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schönián G, Zahner H, Burkhardt E. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 2002 16; 109:9-17.
- Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2001; 98:247-261.
- Kovats RS, Campbell-Lendrum DH, McMichael AJ, Woodward A, Cox JH. Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? *Phil Trans R Soc Lond B* 2001; 356:1057-1068.
- Lainson R, ShawJJ. Evolution, classification and geographical distribution. En: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol, 1. Peters W, Killick Kendrick R, London: Academic Press 1987; 1-120pp.
- Lane RP. Sandflies (Phlebotominae). En: *Medical Insects and Arachnids*. Lane RP and Crossey RW, eds. Chapman y Hall 1993; 78-119.
- Léger N, Depaquit J. Les Phlébotomes. En : *Les Leishmanioses*. Collection Médecine tropicale de l'AUPELF-UREF. Marketing/Ellipses 1999; 90-108.
- Léger N, Depaquit J. Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Revue Française des Laboratoires* 2001; 41-48.
- Léger N, Depaquit J. Systématique et biogéographie des Phlébotomes (Diptera: Psychodidae). *Annales de la Société Entomologique de France* 2002; 38:163-175.
- Léger N, Depaquit J. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:402.

Bibliografía

- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 2002; 109:19-27.
- Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W, Luiz Tafuri W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop* 2004; 92:43-53.
- López-Vélez R, Casado JL, Pintado V. Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:394-395.
- Lucientes-Curdi J, Sánchez-Acedo c, Castillo Hernández JA, Estrada Peña A. Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniosis de Zaragoza. *Rev Iber Parasitol* 1988; 48:7-8.
- Lucientes J, Zárata JJ, Arbea JI, Carles-Tolrá M, Pujade-Villar J. Primeras citas de flebotominos (Diptera: Psychodidae) para Andorra. *Boletín SEA* 2001; 28:129-130.
- Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol* 2011; 27:341-344.
- Maia-Elkhoury AN, Carmo EH, Sousa-Gomes ML, Mota E. Analysis of visceral leishmaniasis reports by the capture-recapture method. *Rev Saude Publica* 2007; 41:931-937.
- Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, Campino L. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol* 2010; 174:336-340.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci* 2009; 87:76-8.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 2012; DOI: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.
- Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zini E, Zatelli A. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 236:1200-1206.
- Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'Oorazi A, Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol* 2001; 15:358-363.

- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 2007; 145:357-360.
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* 2008; 13:256-264.
- Martín Iniesta F, Marín Iniesta E, Martín Luengo F. Papels de perros y zorros como reservorios de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares. *Rev Ib Parasitol* 1982; 42:307-313.
- Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol* 2007; 145:267-273.
- Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V, Morillas-Márquez F. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:795-798.
- Martín Sánchez J, Ruiz Martínez F, Salinas Martínez de Lecea JM, Sánchez Rabasco C, Acedo-Sánchez C, Sanchiz Marín MC, Delgado Florencio V, Morillas Márquez F. *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 from southern Spain: characterisation of the strains from human visceral and cutaneous leishmaniasis and from sandflies; with a numerical analysis of the isoenzymatic data. *Systematic Parasitology* 1996; 33:177-182.
- Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Gómez F, Hernández-Rodríguez S. Epidemiología de la leishmaniasis canina en Córdoba. *Rev Iber Parasitol* 1990; 50:1-7.
- Martínez-Ortega E. Los flebotomos ibéricos (Diptera: Psychodidae). I. Almería. *Ann Biol* 1985a; 3:107-111.
- Martínez-Ortega E. Los flebotomos ibéricos (Diptera: Psychodidae). II. El sureste. *Ann Biol* 1985b; 3:113-119.
- Marty P, Izri A, Ozon C, Haas P, Rosenthal E, del Giudice P, Godenir J, Coulibaly E, Gari-Toussaint M, Delaunay P, Ferrua B, Haas H, Pratlong F, Le Fichoux F. A century of leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Ann Trop Medi Parasitol* 2007; 101:563-574.
- Mencke N. The importance of canine leishmaniosis in non-endemic areas, with special emphasis on the situation in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2012; 124:434-442.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests

Bibliografía

- (immuno-chromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. J Clin Microbiol 2005; 43:5515-5519.
- Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. Acta Trop 2011; 119:69-75.
- Millán J, Zanet S, Gomis M, Trisciuglio A, Negre N, Ferroglio E. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). Transbound Emerg Dis 2011; 58:352-357.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniasis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol. 2008; 24:371-377.
- Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D, Gálvez R. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. Parasit Vectors 2012; DOI: 10.1186/1756-3305-5-60.
- Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. Vet Parasitol 2007; 143:375-379.
- Miró G, Molina R. Leishmaniasis canina: Manejo clínico y situación actual em España. En: Bayer Health Care ed. 2006.
- Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C, Bianciardi P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. Vet Dermatol 2009; 20:397-404.
- Mohebbali M, Fotouhi A, Hooshmand B, Zarei Z, Akhoundi B, Rahnema A, Razaghian AR, Kabir MJ, Nadim A. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. Acta Trop 2007; 103:33-40.
- Molina R. Experimental infections of a *Phlebotomus perniciosus* colony using different procedures. Parasitologia 1991; 33:425-429.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88:491-493.
- Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet Parasitol 2012; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>
- Molina R, Lohse JM, Nieto J. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. Vet Ther 2001; 2:261-267.

- Montoya L, Gállego M, Gavignet B, Piarroux R, Rioux JA, Portús M, Fisa R. Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted *Leishmania infantum* focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76:888-895.
- Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón SD, Morillas-Márquez F, Díaz-Sáez V, Corpas-López V, Martín-Sánchez J. Leishmaniosis en la provincia de Cádiz (sur de España): seroprevalencia y factores de riesgo de la leishmaniosis canina e incidencia en humanos. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 2011; 70:138-144.
- Morales-Yuste M, Morillas-Márquez F, Díaz-Sáez V, Barón-López S, Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol Res* 2012; DOI: 10.1007/s00436-011-2812-7.
- Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002; 18:399-405.
- Moreira ED Jr, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de Carvalho L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol* 2004; 122:245-52.
- Morillas Márquez F. Climate change and infectious diseases in Europe: leishmaniasis and its vectors in Spain. <http://www.thelancet.com/infection> 2010; 10
- Morillas Márquez F, Benavides Delgado I, Gonzalez Castro J, Reyes Magaña A, Valero Lopez A. Occurrence of *Leishmania* spp. in *Rattus rattus* in the province of Granada. *Ann Parasitol hum comp* 1985; 60:768-770.
- Morillas F, Sánchez Rabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocana-Wihelmi J, Acedo C, Sanchís-Marín MC. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res* 1996; 82:569-570.
- Morosetti G, Bongiorno G, Beran B, Scalone A, Moser J, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M. Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. *Geospatial Health* 2009; 4:115-127.
- Mosleh IM, Geith E, Natsheh L, Abdul-Dayem M, Abotteen N. Cutaneous leishmaniasis in the Jordanian side of the Jordan Valley: severe under-reporting and consequences on public health management. *Trop Med Int Health* 2008; 13:855-860.
- Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Peña T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2005; 133:37-47.

Bibliografia

- Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res* 2008; 103:65-68.
- Naucke TJ, Schmitt C. Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? *Int J Med Microbiol* 2004; 293:179-181.
- Neuber H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; 6:754-65.
- Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 1992; 45:33-47.
- Nieto CG, García-Alonso M., Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67:117-130.
- Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 2005; 16:213-232.
- Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 153:19-23.
- Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Gonçalves Filho J, Perri SH. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol* 2010; 170:131-133.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1318-1322.
- Ozbel Y, Balcioğlu IC, Olgen MK, Simsek FM, Töz SÖ, Ertabaklar H, Demir S, Alkan MZ. Spatial distribution of phlebotomine sand flies in the Aydin Mountains and surroundings: the main focus of cutaneous leishmaniasis in western Turkey. *J Vector Ecol* 2011; 36:99-105.
- Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2011; 4:197.
- Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:510-517.
- Palatnik-de-Sousa CB, Silva-Antunes I, Morgado Ade A, Menz I, Palatnik M, Lavor C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. *Vaccine* 2009; 27:3505-3512.

- Palumbo E. Visceral leishmaniasis in children: a review. *Minerva Pediatr* 2010; 62:389-95.
- Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Fytianou A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 104:227-237.
- Papadogiannakis E, Spanakos G, Kontos V, Menounos PG, Tegos N, Vakalis N. Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health* 2010; 57:23-25.
- Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop* 1998; 69:75-83.
- Passantino A. Medico-legal considerations of canine leishmaniasis in Italy: an overview of an emerging disease with reference to the buying and selling of dogs. *Rev Sci Tech* 2006; 25:1111-1123.
- Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol* 2000; 30:1395-1405.
- Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis* 2010; 14:1032-1039.
- Paz GF, Ribeiro MF, Michalsky EM, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Barata RA, Fortes-Dias CL, Dias ES. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2010; 106:523-528.
- Peña MT, Roura X, Davidson MG. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol* 2000; 3:35-41.
- Pesson B, Ready JS, Benabdennbi I, Martín-Sánchez J, Esseghir S, Cadi-Soussi M, Morillas-Márquez F, Ready PD. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Med Vet Entomol* 2004; 18:25-37.
- Petersen CA. Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. *Top Companion Anim Med* 2009; 24:182-188.
- Pineda JA, Martín-Sánchez J, Macías J, Morillas F. *Leishmania* spp infection in injecting drug users. *Lancet* 2002; 360:950-951.

Bibliografía

- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994; 62:229-235.
- Pires CA. Les Phlébotomes du Portugal. I. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 par *Leishmania*, dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann Parasitol Hum Comp* 1984; 59:521-524.
- Pittaluga G. Hallazgo de *Leishmania infantum* (protozoo parásito del “kala-azar infantil”) en la costa de Levante de España. *Bol Inst Nac Hig Alfonso XIII* 1912; 8:137-139.
- Pittaluga G. Leishmaniosis espontánea del perro en la comarca de Tortosa. *Bol Soc Esp Biol* 1913; 2:132-133.
- Pittaluga G, Buen S. Nota sobre los Dípteros del género *Phlebotomus* en España.- *Bol. Inst. Nac. Hig. Alfonso XIII* 1917; 6:137-145.
- Portus M, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, Fisa R, Castillejo S. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev Iber Parasitol* 2002; 62:72-76.
- Portús M, Gállego M, Riera C, Fisa R, Aisa MJ, Botet J, Carrió J, Castillejo S, Iniesta L, López P, Montoya L, Muñoz C, Serra T, Gállego J. A review of human and canine leishmaniosis in Catalonia and associated vector distribution. *Rev Ibér Parasitol* 2007; 67:59-67.
- Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop* 1981; 38:383-393.
- Pratlong F, Dereure J, Ravel C, Lami P, Balard Y, Serres G, Lanotte G, Rioux JA, Dedet JP. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop Med Int Health* 2009; 14:1071-1085.
- Pratlong F, Rioux JA, Dereure J, Mahjour J, Gallego M, Guilvard E, Lanotte G, Perieres J, Martini A, Saddiki A. *Leishmania tropica* au Maroc. IV Diversité isozymique intrafocale. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1991; 66:100-104.
- Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, Dedet JP. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4077-4082.
- Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2009; 136:1915-1934.

- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 2001; 122:253-261.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 1997; 115:143-56.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91:161-168.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2001; 183:1421-1424.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL. 2012; <http://www.R-project.org/>
- Ranque J, Quilici M, Dunan S. Leishmaniasis dans le sud-est de la France-écologie, épidémiologie, prophylaxie. *Acta Trop* 1975; 32:371-380.
- Ready PD. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2008; 27:399-412.
- Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* 2010; 15:19505.
- Ready PD, Croset H. Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera : Psychodidae) from southern France. *Bull Entomol Res* 1980; 70:511-523.
- Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol* 2004; 34:55-62.
- Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Molina I, Gállego M, Portús M. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:899-904.
- Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez M, Muncunill J, Sedeño M, Mascaró M, Udina M, Gállego M, Carrió J, Forteza A, Portús M. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 2008; 48:1383-1389.

Bibliografia

- Riera C, Valladares E. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today* 1996; 12:412.
- Riera C, Valladares JE, Gállego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrió J, Alberola J, Arboix M. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 1999; 84:33-47.
- Rioux JA. Le paradigme "écopathologie" II - Son application à l'épidémiologie des leishmanioses. *Académie des Sciences et Lettres de Montpellier* 2006:35-46.
- Rioux JA, Aboulker JP, Lanotte G, Killick-Kendrick R, Martini-Dumas A. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 21. Influence de la température sur le développement de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Étude expérimentale. *Ann Parasitol Hum Comp* 1985; 3:221-229.
- Rioux JA, Albaret JL, Houin R, Dedet JP, Lanotte G. Ecologie des. Leishmanioses dans le Sud de la France 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du Renard (*Vulpes vulpes*). *Ann Parasitol Hum Comp* 1968; 43:421-428.
- Rioux JA, Croset H, Lanotte G. Écologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation. *Colloque International du C.N.R.S.* 1977; 39:295-305.
- Rioux JA, Guilvard E, Gállego J, Moreno G, Pratlong F, Portús M, Rispaïl P, Gállego M, Bastien P. Intervention simultanée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *P. perniciosus* Newstead 1911 dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes synoptiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). En: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse IMEEE Montpellier. Francia, 1986; 439-444.*
- Rioux JA, Golvan YJ, Croset H, Hoiun R, Juminer B, Bain O, Tour S. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 1. Les Phlébotomes (Echantillonnage – Ethologie). *Ann Parasitol Hum Comp* 1967; 42:561-603.
- Rioux JA, Golvan YJ, Croset H, Tour S, Houin R, Abonnenc E, Petitdidier M, Vollhardt Y, Dedet JP, Albaret JL, Lanotte G, Quilici M. Epidémiologie des Leishmanioses dans le Sud de la France. In : *Monographie 37. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris. France. 1969*
- Rioux JA, Golvan YJ, Houin R, Croset H, Tour S. Résultats d'une enquête écologique sur le foyer leishmanien des Cévennes méridionales. *Revue de Médecine* 1970; 18:1039-1052.
- Rioux JA, Lanotte G, Destombes P, Vollhardt Y, Croset H. Leishmaniose expérimentale du Renard *Vulpes vulpes*. *Récueil de Médecine Vétérinaire* 1971; 147:489-498.

- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 65(3):111-125.
- Rispaill P, Dereure J, Jarry D. Risk zones of human Leishmaniases in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:477-483.
- Rivas-Martínez S. Pisos bioclimáticos de España. En: Lazaroa. Madrid. Spain, 1983; 5:33-43.
- Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4:584.
- Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, Spurck T, Low Choy J, Handman E. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int J Parasitol* 2004; 34:655-664.
- Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop* 2008; 105:158-165.
- Rossi E, Rinaldi L, Musella V, Veneziano V, Carbone S, Gradoni L, Cringoli G, Maroli M. Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy. *Geospat Health* 2007; 1:191-198.
- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol* 2005; 91:970-972.
- Rotureau B. Trypanosomatidés (Protozoa: Trypanosomatidae) parasites des paresseux (Mammalia : Xenarthra). *Bull Soc Pathol Exot* 2006; 99:171-175.
- Ruiz de Ybáñez R, del Río L, Martínez-Carrasco C, Segovia M, Cox J, Davies C, Berriatua E. Questionnaire survey on canine leishmaniosis in southeastern Spain. *Vet Parasitol* 2009; 164:124-133.
- Sacks DL. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* 2001; 3:189-96.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 2008; 103:1-10.
- Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 2011; 138:405-425.

Bibliografia

- Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? Trends Parasitol 2010; 26:466-469.
- Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin JC. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. Trends Parasitol 2008; 24:135-142.
- Schröder W, Schmidt G. Spatial modelling of the potential temperature-dependent transmission of vector-associated diseases in the face of climate change: main results and recommendations from a pilot study in Lower Saxony (Germany). Parasitol Res 2008; 103:55-63.
- Semenza JC, Menne B. Climate change and infectious diseases in Europe. Lancet Infect Dis 2009; 9:365-75.
- Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis 2008; 45:255-272.
- Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ. Canine leishmaniosis in the UK. Vet Rec 2008; 163:253-254.
- Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? Vet Parasitol 2009; 163:281-285.
- Shaw SE, Lerga AI, Williams S, Beugnet F, Birtles RJ, Day MJ, Kenny MJ. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. Vet Rec 2003; 152:176-177.
- Sideris V, Karagouni E, Papadopoulou G, Garifallou A, Dotsika E. Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. Parasite 1996; 3:125-130.
- Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol 2009; 160:55-59.
- Singh SP, Reddy DC, Rai M, Sundar S. Serious underreporting of visceral leishmaniasis through passive case reporting in Bihar, India. Trop Med Int Health 2006; 11:899-905.
- Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A, Gortázar C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. Vet Parasitol 2008; 155:198-203.
- Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Serra R, Gállego M, Ramis A, Fondevila D, Ferrer L. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. Equine Vet J 2003; 35:320-323.
- Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. J Comp Pathol 2004; 130:7-12.

- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2009; 165:1-18.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramis A, Fernández-Bellón H, Rodríguez A, Ferrer L, Alberola J. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *Ann J Trop Med Hyg* 2005; 72:815-818.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 2000; 90:37-45.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 2001; 39:560-563.
- Sundar S, Benjamin B. Diagnosis and treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Assoc Physicians India* 2003; 51:195-201.
- Sundar S, Chakravarty J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. *J Glob Infect Dis* 2010a; 2:159-66.
- Sundar S, Chakravarty J. Antimony toxicity. *Int J Environ Res Public Health* 2010b; 7:4267-4277.
- Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17:136-73.
- Tánczos B, Balogh N, Király L, Biksi I, Szeredi L, Gyurkovsky M, Scalone A, Fiorentino E, Gramiccia M, Farkas R. First record of autochthonous canine leishmaniasis in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12:588-594.
- Tarallo VD, Dantas-Torres F, Lia RP, Otranto D. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy *Acta Tropica* 2010; 116:227-234.
- Teske E, van Knapen F, Beijer EG, Slappendel RJ. Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Vet Scand* 2002; 43:195-201.
- Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann Parasitol Hum Comp* 1993a; 68:104-106.
- Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp* 1993b; 68:107-108.

Bibliografía

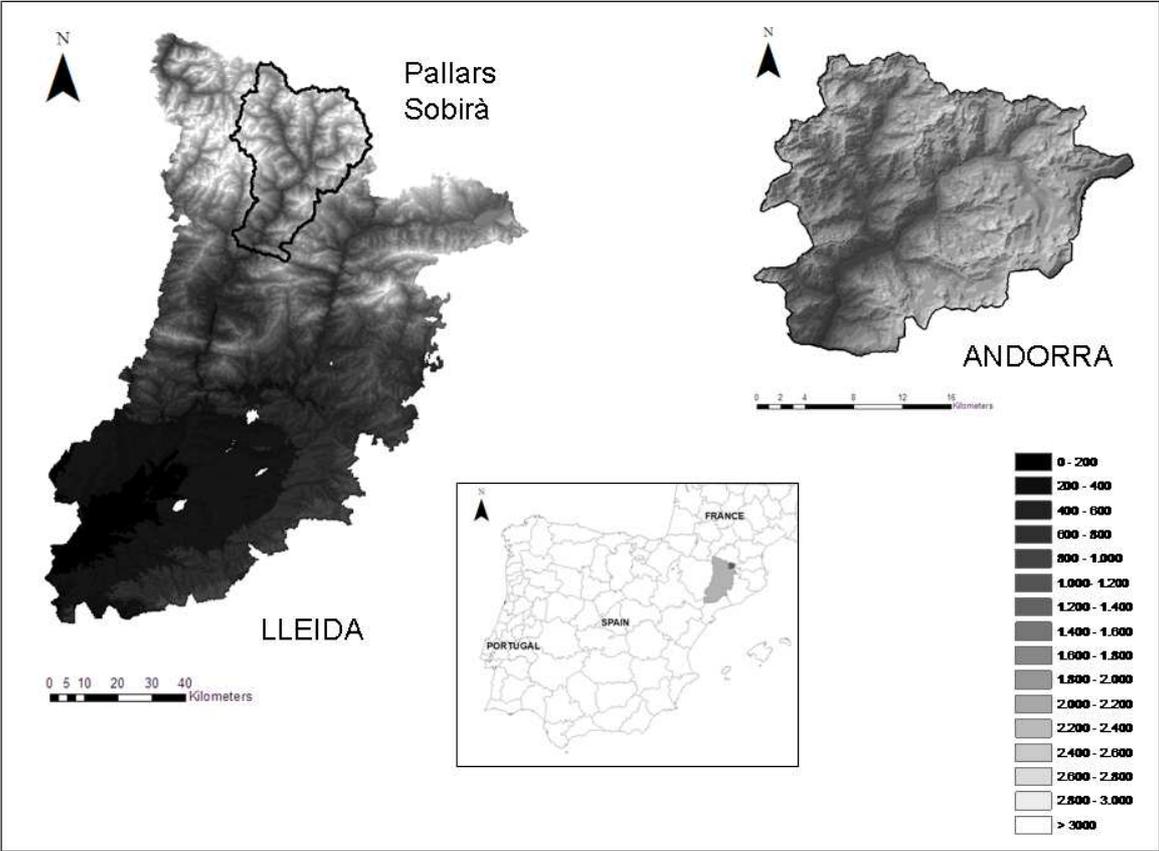
- Valcárcel Y, Bastero R, Anegón M, González S, Gil A. Epidemiología de los ingresos hospitalarios por leishmaniasis en España (1999-2003). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:278-281.
- Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec* 2000; 146:698-703.
- Volf P, Hostomska J, Rohousova I. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite* 2008; 15:237-43.
- Warburg A, Faiman R. Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. *J Vector Ecol* 2011; 36:S10-6.
- Werneck GL, Maguire JH. Spatial modeling using mixed models: an ecologic study of visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad Saude Publica* 2002; 18:633-637.
- World Health Organization. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 2010; 949. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf.
- Yadón ZE, Quigley MA, Davies CR, Rodrigues LC, Segura EL. Assessment of Leishmaniasis notification system in Santiago del Estero, Argentina, 1990-1993. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:27-30.
- Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P, Mignone W. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitol* 1999; 81:11-19.

8. ANEXOS

Anexo 1. Imagen de un flebotomo.



Anexo 2. Zonas de estudio y rango altitudinal (m s.n.m.).



Anexo 3. Imágenes de distintos lugares de captura de flebotomos.



Rural, dentro de población.



Urbano, dentro de población.



Rural, entre poblaciones.



Rural, pared de una granja.



Rural, límite de población.



Urbano, límite de población.

Anexo 4. Imágenes de tipos de agujeros donde se han colocado las trampas.



Agujero en muro de mortero.



Agujero recubierto de plástico.



Agujero con vegetación en el interior.



Agujero de ladrillo en muro de cemento.

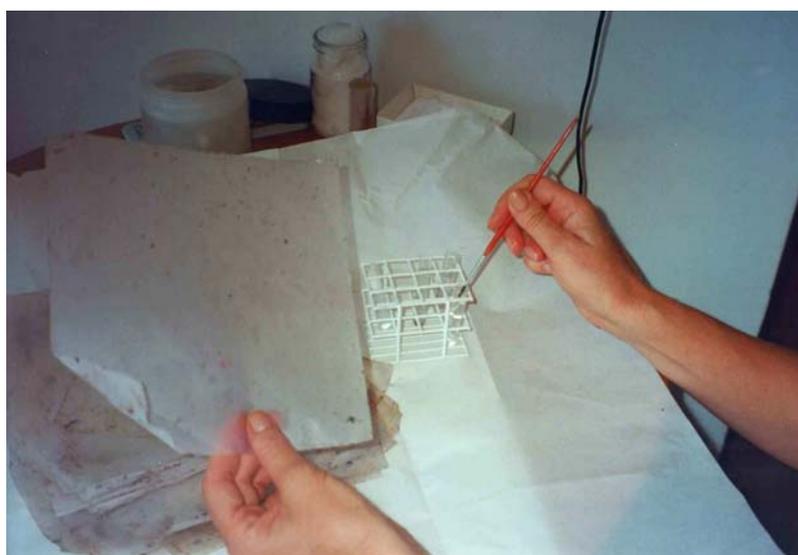
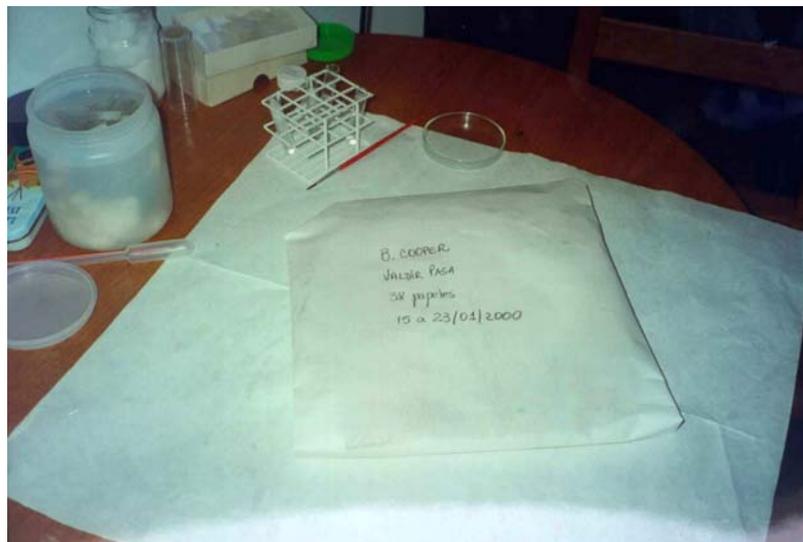


Agujero en muro de piedra y cemento.



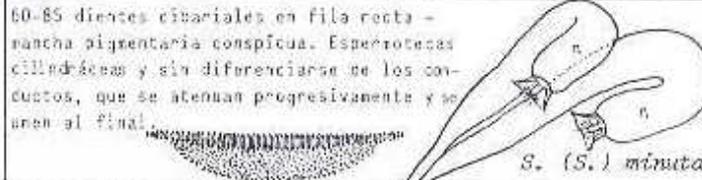
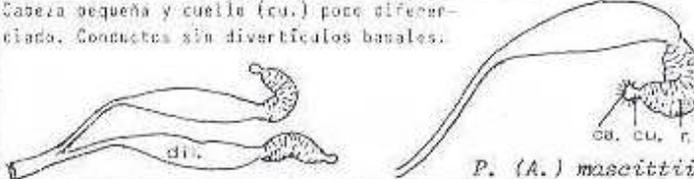
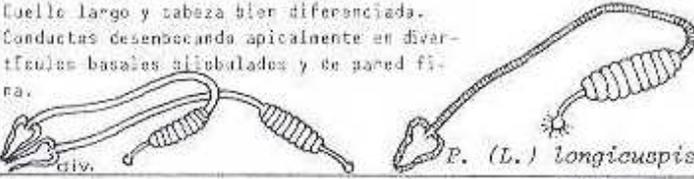
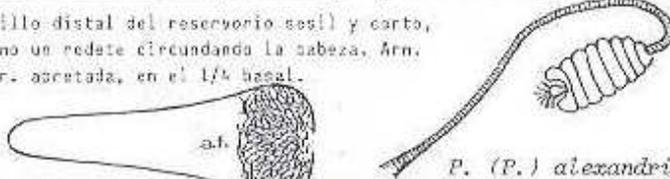
Agujero en muro de piedra.

Anexo 5. Imágenes de la recogida de flebotomos de los papeles adhesivos.



Anexo 6. Claves de identificación de los flebotomos de Gállego Berenguer (1992)

ESPECIES DE <i>Phlebotomidae</i> DE LA PENINSULA IBERICA (IMAGOS ♂)			
GENERO	SUBGENERO	Genitalia externa	ESPECIES
<i>Sergentomyia</i> Estilo con 4 espinas, todas terminales, y 1 seta no raduca (s.n.c.).	<i>Sergentomyia</i> Caracteres del género.		Seta no raduca en lirites de tercios medio y distal del estilo. Valvas penianas (v.p.) en dedo de quarte. <i>S. (S.) minuta</i>
<i>Phlebotomus</i> Estilo con 4-5 espinas, solo 2-3 de ellas terminales.	<i>Adlerius</i> Estilo corto; 5 espinas, 2 terminales. Jufo del coxite (t.) sin lóbulo basal. Filamentos genitales 5,5-11x lg. torba genital.		V. pen. en forma de sable, con punta roma. <i>P. (A.) mascittii</i>
	<i>Larrousius</i> Estilo corto; 5 espinas, 2 terminales. Jufo de setas del coxite (t.) con éstas implantadas directamente en su región media, sin lóbulo basal. Filamentos genitales 3-5x lg. torba genital.		V. pen. dilatadas apicalmente, en bocado de campana. <i>P. (L.) aviasi</i>
			V. pen. finas y alargadas, con extremo agudo, recto o muy ligeramente incurvado. <i>P. (L.) longicauspis</i>
			V. pen. con extrema bifurcación en dos puntas agudas de longitud desigual. <i>P. (L.) perniciosus</i>
	<i>Paraphlebotomus</i> Estilo corto y rechoncho, fusiforme, con 4 espinas largas (2 apicales + 2 submedianas). Paráneros (p.) unirrúneos. Jufo de setas del coxite en un lóbulo basal (l.b.) bien desarrollado.		Estilo corto (lg. 3ca.); solo 1 espina terminal. L. b. ensanchada apicalmente, con 20-25 setas largas. V. pen. de bordes casi paralelos y punta en forma de cáncera. <i>P. (P.) alexandri</i>
			Estilo corto (lg. 3ca.); las 2 espinas apicales terminales, con bases a nivel subigual. L. b. largo y estrecho, con 6-10 s. largas. V. pen. con extremo afilado y transparente. <i>P. (P.) chabaudi</i>
			Estilo muy corto (lg. 2ca.); solo 1 espina terminal. L. b. largo y estrecho, con 6-20 cortas setas. V. pen. gradualmente atenuadas y en pico de rapaz. <i>P. (P.) sergenti</i>
<i>Phlebotomus</i> Estilo largo y delgado, con 5 espinas cortas (3 apicales + 2 submedianas). Paráneros trirrúneos.		Jufo del coxite subapical y con 15 setas + penacho l.b. con 9 setas cortas y finas. Surestilo con 2 espinas terminales espulcadas. V. pen. en forma de pañal. <i>P. (P.) papatasi</i>	

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

Anexo 7. Cuestionario sobre la epidemiología de la leishmaniosis canina enviado a los veterinarios de la provincia de Lleida.

Cuestionario sobre la epidemiología de la Leishmaniosis canina



1. Identificación del veterinario:

Nombre y APELLIDOS:
 Nombre de la Clínica:
 Dirección:
 Población: Comarca: Código postal:
 Teléfono: Fax: Móvil:
 e-mail: Página web:

2. Tipo de clientela: Urbana Rural Mixta Otra
 Si otra, especificar:

3. ¿Cuántos perros recibe en consulta por semana?
 0 1-3 4-10 11-20 más de 20

4. ¿Cuántos perros sospechosos de Leishmaniosis ha visto en los últimos 12 meses?
 0 1-5 6-10 11-20 21-50 más de 50

5. ¿Sobre que signos clínicos basa sus sospechas?

Síntoma	Frecuencia			Importancia dentro de la sospecha diagnóstica (+ a +++)
	Raro	Frecuente	Más frecuente	
Adelgazamiento				
Baja forma				
Anemia				
Hipertermia				
Epistaxis				
Alopecia localizada				
Escamosis				
Onicogriposis				
Ulceraciones				
Adenopatías				
Lesiones oculares				
Lesiones renales				
Esplenomegalia				
Otro				

Si otro, especificar:

6. ¿Cuántos casos confirmados de Leishmaniosis canina ha visto durante los 12 últimos meses?

0 1-5 6-10 11-20 21-50 más de 50

7. ¿Cuántos de estos casos confirmados fueron nuevos?

0 1-5 6-10 11-20 21-50 más de 50

8. ¿Por qué método fueron confirmados estos casos?

- Epidemiología
 Solo clínica
 Serología: IFI
 ELISA
 Kit de detección rápida
 Formoleucogelificación
 PCR
 Parasitología (Microscopía): Punción ganglionar
 Punción de médula ósea
 Biopsia cutánea
 Otra, especificar:.....

9. Estos casos fueron confirmados:

- en su consulta-laboratorio ,
 ¿necesitó ayuda de un laboratorio privado ?
 ¿necesitó ayuda de un laboratorio veterinario comarcal u oficial ?
 Especificar.....
 otro especificar:.....

10. ¿Piensa que estos perros fueron infectados dentro de su zona de actividad?

si no

11. Tiene la sensación que el número de casos de Leishmaniosis canina ha evolucionado dentro de su clientela en el curso de los 10 últimos años hacia un:

Aumento Descenso Ninguna evolución

12. ¿Qué medida de prevención recomienda a los propietarios de los perros?

Collar Spot on Spray Champú Ninguna

13. Si usted no recomienda medidas profilácticas, es porque:

- No las considera eficaces
 Son demasiado costosas
 No sabe donde conseguir las
 El riesgo de leishmaniosis no es importante
 Otro especificar:

14. ¿Vienen las presentaciones antiparasitarias con la indicación «lucha contra los flebotomos»?:

si no

15. Comente las observaciones que crea oportunas

Devolver a: M. Gállego, Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n, 08028-Barcelona (e-mail: mgallego@ub.edu, telèfon: 934024502)

