

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



TESIS DOCTORAL

Factores que influyen sobre la epidemiología de la leishmaniosis canina y sus vectores en la Comunidad de Madrid: obtención de modelos predictivos de riesgo mediante sistemas de información geográfica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rosa Gálvez Esteban

Directores

**Ricardo Molina Moreno
Guadalupe Miró Corrales**

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-3478-6

© Rosa Gálvez Esteban, 2010

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA
LEISHMANIOSIS CANINA Y SUS VECTORES EN LA COMUNIDAD
DE MADRID. OBTENCIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS DE
RIESGO MEDIANTE SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS
CANINA Y SUS VECTORES EN LA COMUNIDAD DE MADRID. OBTENCIÓN DE MODELOS
PREDICTIVOS DE RIESGO MEDIANTE SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA.

Memoria presentada por Rosa Gálvez Esteban para optar al grado de Doctora en
Ciencias Biológicas.

Dirigida por los doctores:

Ricardo Molina Moreno y Guadalupe Miró Corrales

D. Ricardo Molina Moreno, Doctor en Biología e investigador titular de OPIs del Servicio de Parasitología, Instituto de Salud Carlos III y Dña. Guadalupe Miró Corrales, Doctora en Veterinaria y Profesora Titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Factores que influyen sobre la epidemiología de la leishmaniosis canina y sus vectores en la Comunidad de Madrid. Obtención de modelos predictivos de riesgo mediante sistemas de información geográfica” presentado por la licenciada en Biología, Rosa Gálvez Esteban, ha sido realizado en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, Junio de 2010

V⁰B⁰ Directores

Dr. Ricardo Molina Moreno

Dra. Guadalupe Miró Corrales

La interesada

Dña. Rosa Gálvez Esteban

A mis chicos

Si puedes mantener intacta tu firmeza
Si sabes esperar y a tu afán poner brida
Si sueñas, pero el sueño no se vuelve tu rey
Si el triunfo y el desastre no te imponen su ley
y los tratas lo mismo como dos impostores.
Y si puedes llenar el preciso minuto
en sesenta segundos de un esfuerzo supremo
tuya es la tierra y todo lo que en ella habita.

Rudyard Kipling

Agradecimientos

Echando la vista atrás, han sido cinco años muy enriquecedores, en los que he madurado tanto a nivel personal como a nivel profesional, y en los que he aprendido mucho. Parecía que nunca iba a llegar este momento y ya me encuentro al final de este largo y apasionante camino, aunque no hubiera sido capaz de culminar esta tesis sin la ayuda y el apoyo de muchas personas:

A mis dos directores de tesis, Ricardo Molina y Guadalupe Miró, un lujo haber tenido a los mejores dirigiendo mis pasos, gracias por vuestros comentarios, por vuestro tiempo, por vuestros consejos, por inculcarme vuestra pasión... A Ricardo, que depositó su confianza en mí, que me ha formado y que me ha enseñado a volar libre. Gracias porque si no hubieras apostado por mí, nunca habría llegado tan lejos. Por todas las horas que nos hemos pasado en el campo muestreando, gracias, he aprendido mucho. A Lupe, que siempre me has animado a seguir y me has escuchado. Gracias por complementar mi formación biológica con tus conocimientos veterinarios, ya que has enriquecido sobremanera la consecución de este trabajo, ¡ah!, y por acompañarnos a pueblitos muy recónditos para sacar sangre a los perrinos.

A Miguel Ángel Descalzo, has sido el tercer pilar en el que me he apoyado ya que no sólo me has ayudado con la estadística, sino que me has dedicado gran parte de tu tiempo y me has animado mucho. Gracias por tus comentarios, porque me hacías caer en la cuenta de cosas en las que no había reparado.

A Irene Guerrero, por ayudarme en la etapa final de esta tesis, y por colaborar en poner el broche final a este trabajo, ¡gracias!

A la Dra. Teresa Gárate, jefa del servicio de Parasitología, por permitir la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Servicio de Parasitología, en especial a los que tengo o he tenido más cerquita: Inés, Maribel, Chari, David, Edurne, Filipa y Eusebio. A Oihane, gracias por tu ayuda en el campo y en el laboratorio durante tu estancia en el servicio, ¡te lo curraste un montón! A Maribel, muchas gracias por haber hecho el trabajo de campo durante mi baja maternal. A Javier Nieto, gracias por ayudarnos en el muestreo de perros tanto en el campo como en el laboratorio. A Filipa que en el poco tiempo que estuvo, me ayudó a identificar un montón de flebotomos. Aunque ya no está en el servicio, a mi amiga Marta que se fue a las Américas. A Inés, que aunque se incorporó al laboratorio hace poco, ha demostrado ser muy

buena compañera. A Alejandra por nuestras conversaciones de pasillo. A Eusebio que siempre estuvo dispuesto a ayudar. A Chari, porque gracias al contrato de la CM me reenganché al mundo de la investigación, tras más de dos años dedicada exclusivamente a la docencia.

A los doctores Ignacio García Más y Benito Muñoz Araujo, y al equipo docente de la asignatura de "Parasitología" porque fue en sus clases donde descubrí lo que me apasionaba ese mundo.

A todos los veterinarios y dueños de perros que colaboraron en la consecución de este trabajo. Y a todas las personas que, a pesar de no entender muy bien porque poníamos papeles impregnados en aceite para "cazar mosquitos", nos permitían el acceso a sus casas o propiedades, en especial a los guardeses del Palacio de Milla.

A mis mejores amigas, las que hice en la carrera hace ya 15 años, Ele, Leyre, Nerea, Ana y Belén. Gracias a todas por vuestros ánimos, e incluso por escuchar los ensayos de mis charlas, sois más majas... A tod@s mis amigos biólogos, en especial a Aída. A las dos amigas del "cole" que me quedan, Sara e Izaskun.

A la familia Barón: Ana, Luisa, Andrea, Pilar y Javier, gracias por haber hecho de canguro a tiempo completo, me lo habéis hecho todo mucho más fácil.

A mis hermanos Tomás y Diego, y a la nueva, Nicanora, gracias por apoyarme y confiar ciegamente en mí, cosas de hermanos mayores.

A mis padres que me han inculcado el afán de superación, gracias por vuestro apoyo incondicional. A mi padre, que tantas y tantas tardes se ha pasado con Marco, e incluso se ha leído partes de mi tesis.

Al Churrito, sin ti imposible, has sido parte indiscutible en esta tesis, has sido mi diseñador gráfico, mi traductor de inglés, mi canguro, mi paño de lágrimas... ¡si es que vales un montón! Gracias por tu apoyo, por tu cariño y por ser como eres. Me alegro de haberme tropezado contigo en esta vida.

Y en último lugar, aunque no por ello menos importante, al que ha venido en medio de esta vorágine, Marcolino. Eres un ángel que ha aparecido en medio del camino.

ABREVIATURAS Y SIGLAS



aC: Antes de Cristo
AD: Apparent density
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AEMET: Agencia estatal de meteorología
AIC: Akaike information criterion (Criterio de información de Akaike)
AMVAC: Asociación madrileña de veterinarios de animales de compañía
AOGCM: Atmosphere-ocean general circulation model
AUC: Area under the ROC curve (Área bajo la curva ROC)
BCG: Bacillus de Calmette y Guérinas
BECM: Boletín epidemiológico de la Comunidad de Madrid
BIC: Bayesian information criterion (Criterio de información Bayesiano)
CI: Confidence interval
CM: Comunidad de Madrid
CMBD: Conjunto mínimo básico de datos
COLVEMA: Colegio oficial de veterinarios de Madrid
DAP: Densidad aparente
DAT: Direct agglutination test (Test de aglutinación directa)
dt: Desviación típica
DTH: Prueba de hipersensibilidad retardada o Test de Montenegro
EDEN: Emerging diseases in a changing European environment
EDO: Enfermedades de declaración obligatoria
ELISA: Enzimoimmunoensayo
ENOA: El Niño/oscilación austral
ENM: Ecological niche modelling (Modelo de nicho ecológico)
ESA: European space agency (Agencia espacial Europea)
FML: Ligando fructosa-manosa
GARP: Genetic algorithm for rule-set prediction
GEI: Gases de efecto invernadero
GIS: Geographic information system
GPS: Global positioning system (Sistema global de posicionamiento)
HAART: Highly active antiretroviral treatment (Terapia antiretroviral altamente activa)
IC: Intervalo de confianza
IgG: Inmunoglobulina G
IL: Interleuquina
IFI: Inmunofluorescencia indirecta
IFN: Interferón
IPCC: Intergovernmental panel on climate change (Panel intergubernamental del cambio climático)
IQR: Interquartile range (Rango intercuartílico)

IRR: Incidence rate ratio

LCH: Leishmaniosis cutánea humana

Lcan: Leishmaniosis canina

LMC: Leishmaniosis mucocutánea

LPDK: Leishmaniosis dérmica post kala-azar

LST: Land surface temperature (Temperatura de la superficie terrestre)

LVH: Leishmaniosis visceral humana

MDP: Muramil dipéptido

MDT: Modelo digital del terreno

MERIS: Medium resolution imaging spectrometer

NDVI: Normalized difference vegetation index (Índice diferencial de vegetación normalizado)

NLF: Nearest livestock farm

NNN: Novy-Nicolle-McNeal

NO: Óxido nítrico

NTDs: Neglected tropical diseases (Enfermedades tropicales olvidadas)

OMS: Organización mundial de la salud

OR: Odds ratio o razón de oportunidades

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PSG: Promastigote secretory gel

R₀: Número de reproducción básico

Ref: Categoría de referencia

REGA: Registro de explotaciones ganaderas

RFLP: Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

ROC: Receiver operating characteristic (Característica operativa del receptor)

RR: Riesgo relativo

RTI: Razón de tasas de incidencia

RTQ-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

SAA: Spatial analyst application (Extensión de análisis espacial)

SGBD: Sistemas gestores de las base de datos

SIG: Sistemas de información geográfica

SMF: Sistema mononuclear fagocitario

SRES: Special report on emission scenarios o escenarios de emisiones

TDR: Training in tropical diseases

TFN: Tumor necrosis factor o factor de necrosis tumoral

US: Urban settlement

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

WHO: World health organization

X²: Chi-cuadrado

ÍNDICE

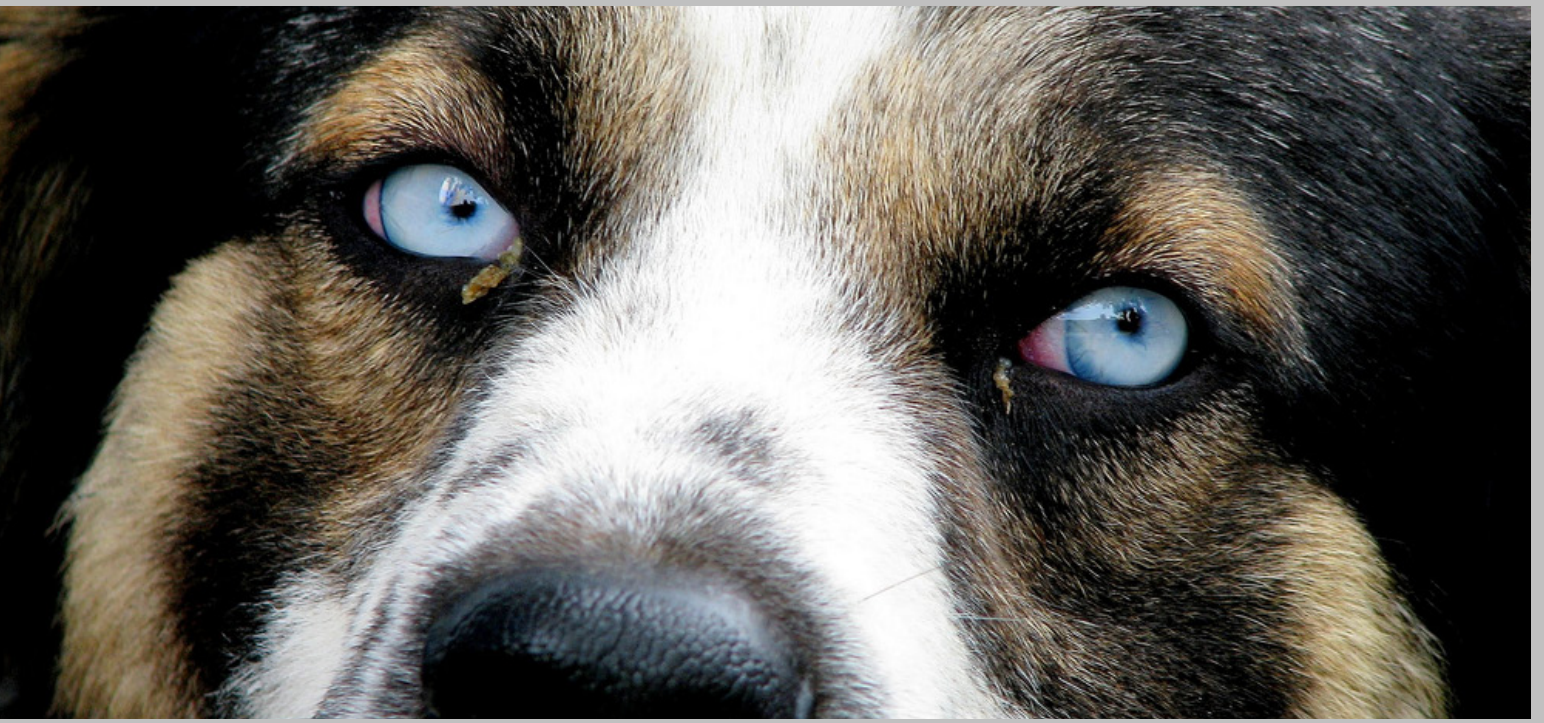


ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	11
Abreviaturas y siglas	13
Índice general	17
I. INTRODUCCIÓN	21
I.1. IMPACTO MUNDIAL DE LA LEISHMANIOSIS	23
I.1.1. Antecedentes de la leishmaniosis en la cuenca mediterránea	25
I.1.2. Globalización de la leishmaniosis en Europa	26
I.2. LEISHMANIOSIS CANINA	27
I.2.1. Epidemiología	27
I.2.1.1. El parásito	27
I.2.1.1.1. Ciclo biológico	28
I.2.1.2. El vector	29
I.2.1.2.1. Ciclo biológico	33
I.2.1.3. El reservorio	35
I.2.1.3.1. Factores de riesgo	36
I.2.1.4. Vías de transmisión	38
I.2.1.4.1. Transmisión vectorial	38
I.2.1.4.2. Otras formas de transmisión	41
I.2.1.5. Poder infectante	41
I.2.1.6. Distribución geográfica	42
I.2.2. Inmunopatología de la infección por <i>L. infantum</i>	44
I.2.3. Cuadro clínico	48
I.2.4. Diagnóstico	52
I.2.4.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico	52
I.2.4.2. Diagnóstico laboratorial	52
I.2.4.2.1. Diagnóstico parasitológico	52
I.2.4.2.2. Inmunodiagnóstico	54
I.2.4.2.3. Alteraciones clínico-patológicas	55
I.2.4.3. Diagnóstico diferencial	56
I.2.5. Control	56
I.2.5.1. Terapéutica	57
I.2.5.2. Inmunoprofilaxis	59
I.2.5.3. Lucha antivectorial	62

I.3. ANÁLISIS ESPACIAL DE ENFERMEDADES	64
I.3.1. Aplicación de los SIG a las enfermedades transmitidas por vectores	66
II. OBJETIVOS	71
III. MATERIAL Y MÉTODOS	75
III.1. ÁREA GEOGRÁFICA DE ESTUDIO	77
IV. RESULTADOS	79
CAPÍTULO 1: <i>Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain)</i>	81
CAPÍTULO 2: <i>Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain</i>	91
CAPÍTULO 3: <i>Mapping current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector based on environmental variables and expected climate change in the Madrid region (Spain)</i>	101
V. DISCUSIÓN	113
V.1. ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA	116
V.2. ESTUDIO DEL FLEBOTOMO VECTOR	120
V.3. CONSTRUCCIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS ESPACIALES Y TEMPORALES DEL FLEBOTOMO VECTOR	126
VI. CONCLUSIONES	131
VII. BIBLIOGRAFÍA	135

I. INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

I.1. IMPACTO MUNDIAL DE LA LEISHMANIOSIS

La leishmaniosis engloba a un grupo de enfermedades causadas por más de 20 especies de parásitos flagelados pertenecientes al género *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que afectan tanto al ser humano como a otros vertebrados. Es endémica en extensas áreas tropicales, subtropicales y de clima templado, excepto en Australasia y el sureste asiático (Ashford, 2000). Entre todas las enfermedades tropicales, la mortalidad que presenta la leishmaniosis es superada únicamente por la malaria (Chappuis y col., 2007; Bern y col., 2008). Se enmarca dentro del grupo de enfermedades tropicales olvidadas (NTDs: *neglected tropical diseases*) (Brooker y Utzinger, 2007), debido a su asociación con la pobreza y a la escasez de recursos disponibles en materias de tratamiento, diagnóstico y control (Alvar y col., 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye la leishmaniosis en la categoría de enfermedades emergentes y sin control (Murray y col., 2005). Se estima que unos 350 millones de seres humanos de 88 países están expuestos a la infección. Con una prevalencia aproximada de 12 millones de personas, cada año surgen 2 millones de casos nuevos, 1,5 millones de leishmaniosis cutánea humana (LCH) y 500.000 de leishmaniosis visceral humana (LVH); y se producen 70.000 muertes (Reithinger y col., 2007). Se calcula que las pérdidas por discapacidad afectan a más de 2 millones de personas (Brooker y Utzinger, 2007). El número real de casos de leishmaniosis es notablemente mayor que el obtenido a partir de la detección pasiva, ya que sólo se considera enfermedad de declaración obligatoria en 33 de los 88 países afectados y porque, incluso en estos países, existe una importante subdeclaración (Desjeux, 2004).

La mayoría de las leishmaniosis son zoonosis rurales o periurbanas en las que el humano se infecta de forma esporádica. En cambio, en las leishmaniosis antroponóticas, con un componente urbano más acusado, el ser humano actúa como reservorio de la enfermedad y hospedador susceptible al mismo tiempo.

Las manifestaciones clínicas descritas abarcan desde pequeñas úlceras cutáneas de carácter benigno hasta graves afecciones viscerales. La base patogénica de la infección por *Leishmania* consiste en la destrucción de las células del sistema mononuclear fagocitario (SMF) por parte del parásito. Las manifestaciones clínicas de la leishmaniosis son diversas y se clasifican en: cutánea (localizada o difusa) (LCH), mucocutánea (LMC), visceral o kala-azar (LVH) y dérmica post kala-azar (LDPK). La LCH se caracteriza por la aparición de úlceras en el lugar de la picadura del flebotomo que suelen dejar cicatrices y que en algunos casos pueden

estigmatizar socialmente a quien las sufre. Esta manifestación la originan unas 17 especies de leishmanias diferentes en todo el mundo (Reithinger y col., 2007). La LCH difusa al igual que la LMC nunca curan espontáneamente, por lo que precisan de tratamiento específico.

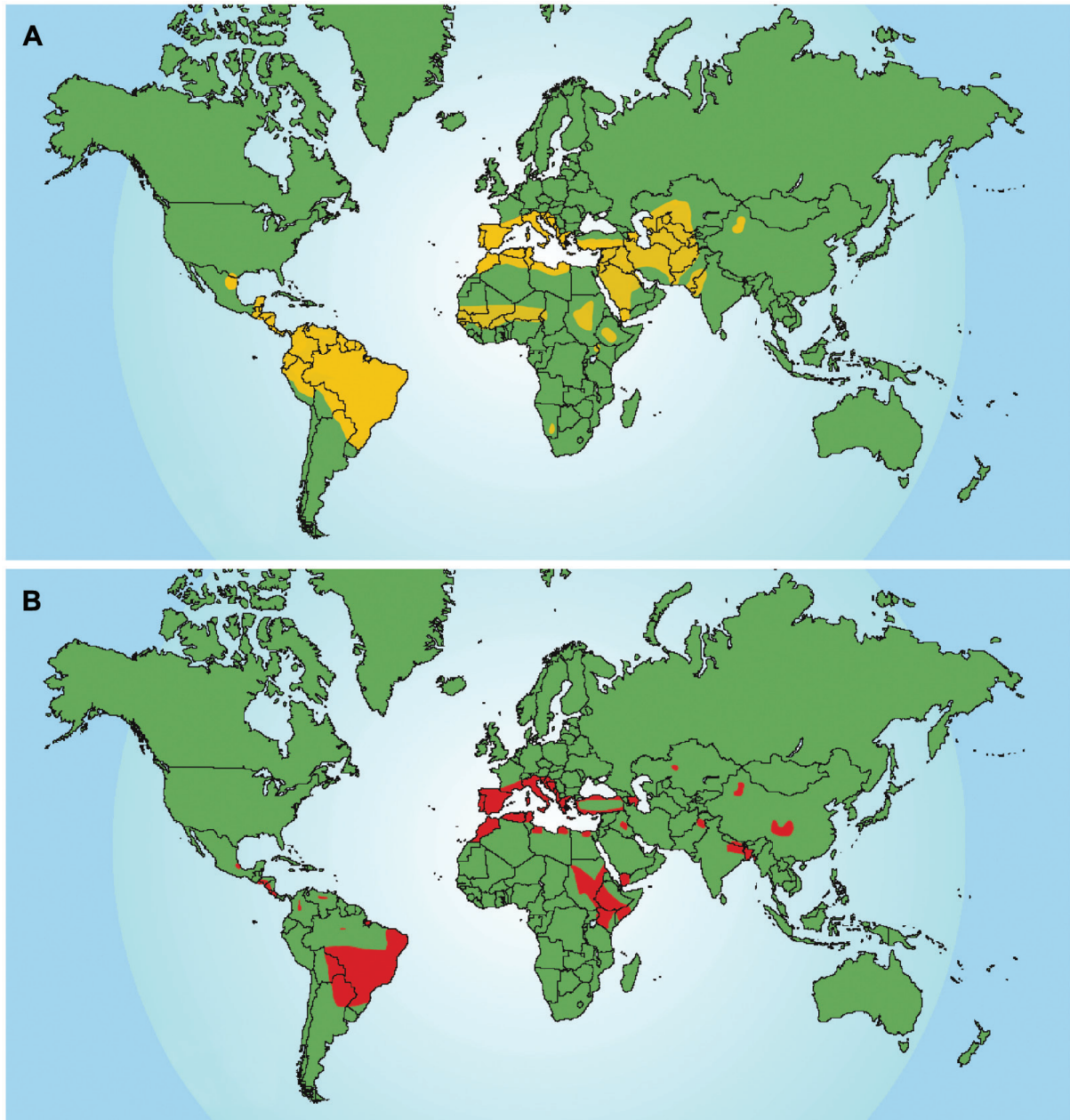


Figura I.1. A: Distribución mundial de la leishmaniosis cutánea. El 90% de los casos ocurren en Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudí, Argelia, Irán, Brasil y Perú. B: Distribución mundial de la leishmaniosis visceral. El 90% de los casos ocurren en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal y Sudán. Adaptado de Chappuis y col. (2007) y OMS (2005).

En la manifestación mucocutánea, meses o años después de aparecer las primeras lesiones cutáneas, los enfermos sufren una destrucción progresiva de las mucosas que puede ocasionar mutilaciones. A nivel mundial se han descrito unas 6 especies de

leishmanias causantes de manifestaciones mucocutáneas. La manifestación visceral es la más grave, y suele ser mortal si no se instaura un tratamiento eficaz. El parásito infecta principalmente a los macrófagos de órganos hematopoyéticos (hígado, bazo y médula ósea), causando graves disfunciones orgánicas. Cabe destacar que todos los agentes causales de LVH pueden dar lugar también a manifestaciones cutáneas. La LVH está producida por *Leishmania donovani* en África oriental, subcontinente Indio y China; y por *Leishmania infantum*, sinónimo de *Leishmania chagasi* en el Nuevo Mundo (Mauricio y col., 2000), en Europa, norte de África y América Latina. *Leishmania infantum* se caracteriza por presentar un ciclo zoonótico de la enfermedad donde juegan un importante papel como reservorios los mamíferos, tanto domésticos - el perro principalmente - como silvestres. En cambio, *L. donovani* es una antroponosis, donde el humano se comporta como reservorio de la enfermedad. La LDPK causada por *L. donovani* se presenta principalmente en el subcontinente Indio y Sudán. Meses o años después de un kala-azar, aparentemente curado, aparece un cuadro de lesiones papulares o nodulares dispersas en la piel de los pacientes.

1.1.1. ANTECEDENTES DE LA LEISHMANIOSIS EN LA CUENCA MEDITERRÁNEA

Tradicionalmente, la leishmaniosis humana se ha considerado como una enfermedad pediátrica (de ahí el nombre de *L. infantum*), pero la irrupción durante la década de los años 80 de la coinfección con VIH (de la Loma y col., 1985), ocasionó un inesperado giro en el panorama epidemiológico de la enfermedad. La inmunosupresión inducida por la presencia del VIH, originó una gran epidemia de casos asociados a la infección por *Leishmania*. Desde el año 1996, coincidiendo con la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART), la coinfección se vio drásticamente mermada (Gramiccia y Gradoni, 2005). La incidencia de LVH en pacientes VIH positivos ha disminuido entre un 50 y un 65% en la cuenca mediterránea tras la aplicación de dicha terapia (Alvar y col., 2008).

Actualmente, la leishmaniosis humana se considera una enfermedad hipoendémica en la cuenca mediterránea occidental con una tasa de incidencia de 0,02 a 0,49 casos por cada 100.000 habitantes. Si se incluye Turquía aumenta a 8,53/100.000, pero hay que tener en cuenta que en este país, aparte de la LVH también se presenta la LCH antroponótica causada por *Leishmania tropica*. En Europa es patente la subdeclaración. El sistema de notificación varía según el país, por ejemplo en Francia esta enfermedad no es de declaración obligatoria, pero en Grecia, Italia, Chipre, Turquía y en 12 de las 17 Comunidades Autónomas españolas (exceptuando la Comunidad Valenciana, Galicia, País Vasco, Castilla-La Mancha y Principado de Asturias) son de declaración obligatoria tanto la LVH como la LCH; en Portugal en cambio la declaración se restringe a la LVH (Dujardin y col., 2008).

En España, el sistema de enfermedades de declaración obligatoria (EDO), sitúa la tasa de incidencia de la leishmaniosis humana en torno a 0,3 casos por cada 100.000 habitantes. Pero este valor no se puede considerar absoluto, ya que existe una importante subdeclaración en dicho sistema. Además la leishmaniosis, enfermedad de declaración obligatoria desde 1982 a nivel estatal, ha pasado a partir del 1 de julio de 1996, a ser competencia de cada Comunidad Autónoma. Han aparecido nuevos sistemas de información de la actividad asistencial hospitalaria, como el CMBD (conjunto mínimo básico de datos), que se ajustan mucho más a la realidad. El CMBD analiza los datos de morbilidad hospitalaria mediante la revisión de los ingresos hospitalarios, entre cuyos diagnósticos principal o secundarios figure esta enfermedad. En la Comunidad de Madrid, estudios realizados desde el 1991 hasta el 2004, a partir del CMBD, registran una incidencia anual que cuadruplica la registrada por el sistema EDO, para el mismo periodo (BECM, 1999, 2005; Valcárcel y col., 2008).

1.1.2. GLOBALIZACIÓN DE LA LEISHMANIOSIS EN EUROPA

La distribución de la leishmaniosis a lo largo del continente europeo ya no está limitada a la cuenca mediterránea y se ha extendido a zonas que hasta ahora se habían mantenido libres de la enfermedad (Ready, 2010). Así, se han establecido recientemente nuevos focos en las estribaciones de cadenas montañosas como los Alpes (Maroli y col., 2008; Morosetti y col., 2009; Otranto y col., 2009) o los Pirineos (Dereure y col., 2009).

En Alemania se estima que hay unos 20.000 perros infectados, importados por turistas desde zonas endémicas del sur de Europa (Naucke y col., 2008). La presencia de reservorios infectados unido al hallazgo de *Phlebotomus perniciosus*, uno de los vectores más importantes en países del centro de Europa como Suiza (Grimm y col., 1993) o Alemania (Naucke y Schmitt, 2004), plantean la hipótesis de una posible emergencia de la enfermedad en latitudes donde tradicionalmente no existía (Harms y col., 2003; Jacob, 2008; Schroder y Schmidt, 2008).

En la región central de Europa se han sucedido los hallazgos de flebotomos, tanto sospechados (*Phlebotomus mascittii*) como probados (*P. perniciosus*) de transmitir *L. infantum*, más allá de los límites geográficos habituales para estos insectos. El hallazgo de flebotomos en países como Alemania (Naucke y Schmitt, 2004), Bélgica (Depaquit y col., 2005) o Suiza (Grimm y col., 1993) hacen sospechar que estas poblaciones son realmente vestigios de áreas de dispersión mayores que fueron colonizadas por estos artrópodos durante el calentamiento natural que surgió hace unos 6.000 años durante el Holoceno medio (Aspöck, 2008).

En la propagación de la leishmaniosis hacia el norte de Europa juegan un papel muy importante la introducción del parásito por medio de la importación de animales infectados, procedentes de áreas endémicas (Naucke y col., 2008; Semenza y Menne, 2009; Reisen, 2010), y la proliferación de las poblaciones de vectores en estas zonas, bajo la premisa del cambio climático (Cross y Hyams, 1996; Githeko y col., 2000; Peterson y Shaw, 2003; Dufour y col., 2008; González y col., 2010).

I.2. LEISHMANIOSIS CANINA

La leishmaniosis es en nuestro entorno una zoonosis causada por *L. infantum*, donde se manifiestan tanto la forma visceral como la cutánea. El perro es, sin duda, el principal reservorio doméstico de *L. infantum*. El alto porcentaje de perros infectados en zonas endémicas representa no sólo un problema veterinario sino también de salud pública.

I.2.1. EPIDEMIOLOGÍA

La cadena epidemiológica de esta enfermedad la conforma el hospedador vertebrado parasitado o reservorio principal (en este caso el perro) y el hospedador invertebrado o vector (flebotomo).

I.2.1.1. El parásito

Las especies del género *Leishmania* pertenecen al grupo de protozoos uniflagelados carentes de actividad fotosintética. Contienen una mitocondria única que alberga al kinetoplasto, estructura especial rica en ADN que se sitúa en las proximidades del cuerpo basal del flagelo. Actualmente se acepta la clasificación de Cavalier-Smith (1998):

Reino	Protozoa
Filo	Euglenozoa
Subfilo	Saccostoma
Clase	Kinetoplastea
Orden	Trypanosomatida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>
Especie	<i>infantum</i>

Figura I.2. Posición taxonómica de *Leishmania infantum* (Cavalier-Smith, 1998).

La clasificación de las distintas especies del género *Leishmania* es muy compleja debido a que son morfológicamente indistinguibles, sin embargo es primordial su diferenciación y caracterización genética para establecer un mejor diagnóstico, tratamiento, pronóstico y control. Los métodos de identificación que se emplean actualmente están basados en métodos de caracterización fenotípicos, como isoenzimas y anticuerpos monoclonales o genotípicos, como el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), hibridación con sondas de ácidos nucleicos y técnicas de amplificación del ADN (Mateo, 2007). *Leishmania infantum* incluye 31 zimodemas, siendo el zimodema MON-1 el causante de la mayoría de las infecciones en el perro (Gállego y col., 2001).

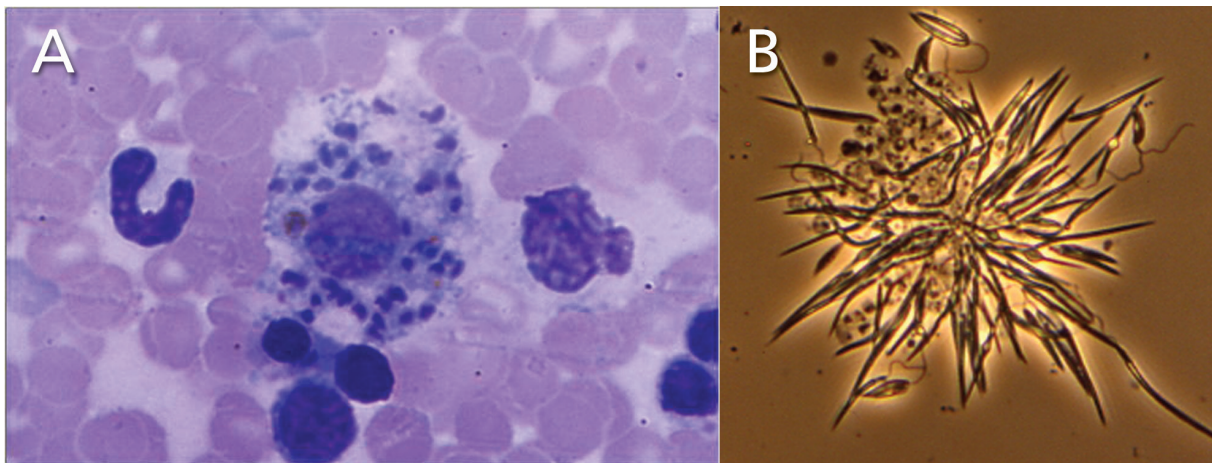


Figura 1.3. *Leishmania infantum*. A: Amastigotes en el interior de un macrófago (G. Miró). B: Promastigotes (R. Molina).

1.2.1.1.1. Ciclo biológico

Leishmania es un parásito digénico que desarrolla su ciclo biológico en dos tipos de hospedadores. Una parte del ciclo biológico la realiza en el tubo digestivo del flebotomo en la forma móvil y flagelada, el promastigote; la otra parte del ciclo tiene lugar en el interior de los macrófagos del reservorio mediante la forma inmóvil - sin flagelo funcional -, el amastigote (Figura 1.4).

Los promastigotes, inoculados por el vector en el transcurso de una picadura, son fagocitados por los macrófagos del hospedador vertebrado y quedan incluidos en una vacuola parasitófora. En ella eluden las reacciones inmunológicas inespecíficas del macrófago, se transforman en amastigotes y se multiplican por fisión binaria. Cuando alcanzan un número elevado, la célula estalla y los amastigotes libres son fagocitados por otros macrófagos, bien de las proximidades (macrófagos cutáneos), bien de tejidos a los que llegan tras su diseminación por vía linfohematógena o mucosas, produciéndose una diseminación orgánica completa. La progresión de

la enfermedad dependerá de las condiciones del hospedador infectado (eficacia de la respuesta inmune, condiciones socioeconómicas y predisposición genética) (Reithinger y col., 2007), de la virulencia del parásito y de la dosis infectante inoculada por el vector. Los macrófagos cutáneos parasitados circulantes pueden volver a ser ingeridos por otro flebotomo en el transcurso de una nueva picadura. En el intestino medio del insecto, los macrófagos y las otras células ingeridas son digeridos, quedando libres los amastigotes que enseguida se transforman en promastigotes procíclicos y se multiplican de forma activa mediante fisión binaria longitudinal. Tras varios días alcanzan la capacidad infectante - denominándose a este proceso metaciclogénesis - y se amontonan en la válvula estomodeal, donde permanecen a la espera de ser inoculados a otro hospedador vertebrado en el transcurso de una nueva picadura, completándose así el ciclo.

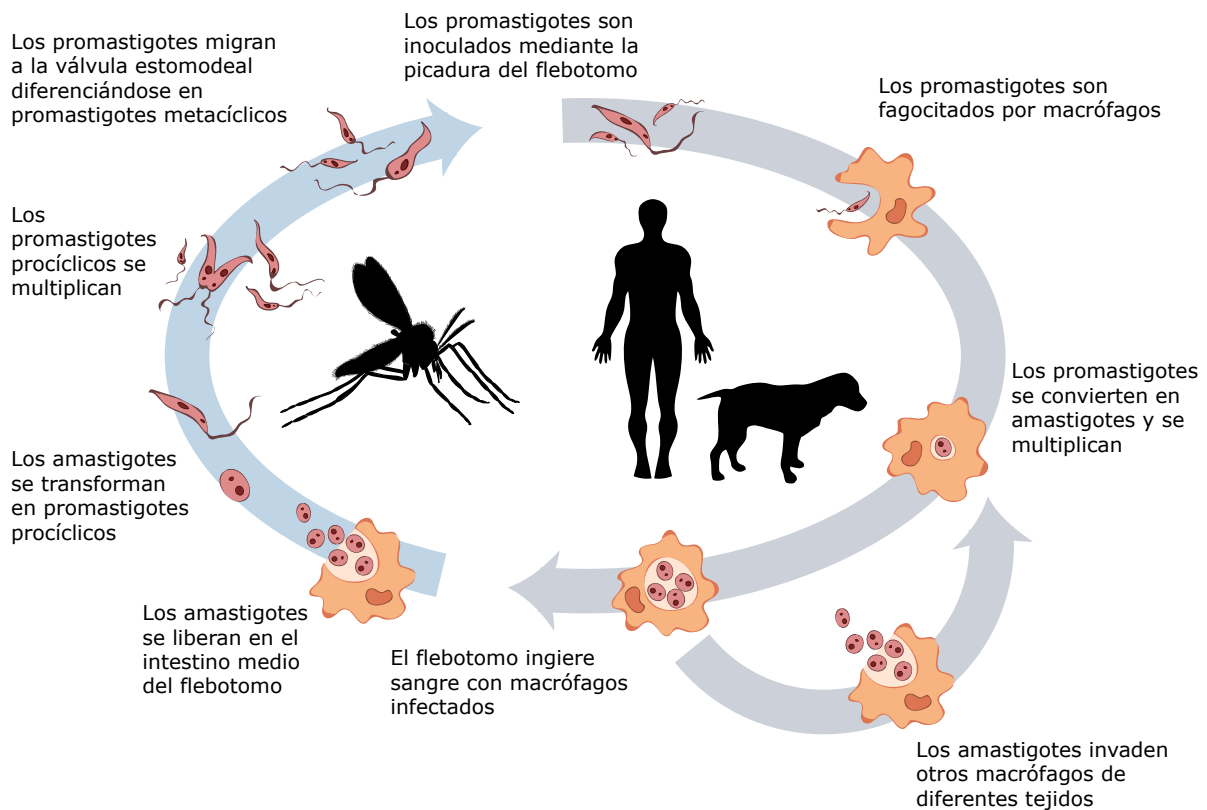


Figura I.4. Ciclo biológico de *Leishmania infantum* (J. Barón y R. Gálvez).

I.2.1.2. El vector

Los vectores de las diferentes especies de *Leishmania* son única y exclusivamente las hembras de los flebotomos (Figura I.5).



Figura I.5. *Phlebotomus perniciosus*. Detalle de dos hembras alimentándose sobre un criceto, una de ellas con el abdomen repleto de sangre (R. Molina).

Se trata de dípteros nematóceros pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae (Killick-Kendrick, 1999) (Figura I.6).

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Mandibulata
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Nematocera
Familia	Psychodidae
Subfamilia	Phlebotominae
Género	<i>Phlebotomus</i>
Especie	<i>perniciosus</i> <i>ariasi</i>

Figura I.6. Posición taxonómica de los flebotomos vectores de *L. infantum* en España, *P. perniciosus* y *P. ariasi* (Killick-Kendrick, 1999).

Se conocen más de 800 especies pertenecientes a esta subfamilia repartidas por todo el mundo (Munstermann, 2005), de ellas sólo 30 son vectores probados (Bates, 2007; Reithinger y col., 2007). En la transmisión de la infección por *Leishmania* participan especies de los géneros *Phlebotomus*, en Europa, África y Asia; y *Lutzomyia*, en el

continente americano desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Munstermann, 2005; Reithinger y col., 2007). Los vectores probados de *L. infantum* en España son *Phlebotomus ariasi* y *P. perniciosus*, donde *P. perniciosus* predomina en las zonas áridas o semiáridas de la Península Ibérica y *P. ariasi* queda restringido a regiones húmedas y templadas (Miró y Molina, 2006). En España, *P. perniciosus* es sin duda la principal especie reconocida como vectora de la infección por *L. infantum*, tanto en el perro como en el ser humano, protagonismo que comparte de forma puntual con *P. ariasi* en algunos focos septentrionales de la Península Ibérica y sobre todo en cotas elevadas (Gállego y col., 1990; Lucientes-Curdi y col., 1991; Aransay y col., 2004; Gálvez y col., 2010b). *Phlebotomus langeroni*, vector probado en Egipto (Doha y Shehata, 1992), también está presente en nuestro país, pero esporádicamente y en unas densidades bajísimas (Martínez-Ortega y col., 1992; Conesa Gallego, 1994; Lucientes y col., 1994; Lucientes y col., 1995).

La **distribución geográfica** de los flebotomos se extiende entre los 50° N y los 40° S, exceptuando Nueva Zelanda e islas del Pacífico (Killick-Kendrick, 1999).

La **comunicación** entre los flebotomos de una misma especie se verifica mediante feromonas (Ward, 1993) y sonidos producidos por las alas (Ward, 1988; Jones y Hamilton, 1998). Existen feromonas sexuales y de oviposición, que estimulan el apareamiento (Ward y Morton, 1991; Jones y Hamilton, 1998) y la puesta de los huevos (Elnaiem y Ward, 1991; Dougherty y col., 1994), respectivamente.

El **apareamiento** dura varios minutos y, según la especie, tiene lugar antes, después o durante la ingesta de sangre (Killick-Kendrick, 1999). Nunca se produce antes de que los machos hayan rotado su genitalia a la posición definitiva (se requieren unas 24 horas para ello).

En cuanto a la **fenología**, son activos durante todo el año en áreas tropicales mientras que en regiones templadas sólo lo son en las estaciones más suaves. El periodo de actividad de las dos especies vectoras de *L. infantum* en nuestras condiciones climáticas (*P. perniciosus* y *P. ariasi*), se extiende principalmente de mayo a octubre (Miró y Molina, 2006), excepto en el sur donde su actividad se extiende de marzo a diciembre (Morillas Márquez, 1982; Martínez Ortega, 1986). En nuestras latitudes, las larvas de cuarto estadio larvario sobreviven a los rigores del invierno en diapausa (Ready y Croset, 1980; Schlein y col., 1990). En condiciones climatológicas normales la dinámica estacional del principal vector de la *L. infantum* en la Península Ibérica, *P. perniciosus*, presenta una fluctuación de tipo difásica, con una elevación que coincide con el final de la primavera y el

principio del verano (junio-julio) y otra en el inicio del otoño (septiembre-octubre) (Morillas Márquez y col., 1983; Lucientes Curdi, 1986; Sanchís Marín, 1986; Martínez Ortega y Conesa Gallego, 1987; Botet y col., 1989; Morillas Márquez y col., 1991; Seguí, 1991a, b; Wolf Echeverri, 1996; Castillejo, 2007; Gálvez y col., 2010b). El comportamiento de *P. ariasi* es, en general, de tipo difásico en la Península Ibérica y Menorca, con dos máximos, uno en abril-junio y otro en octubre (Morillas Márquez y col., 1983; Lucientes Curdi, 1986; Martínez Ortega y Conesa Gallego, 1987; Seguí, 1991a, b; Castillejo, 2007). En cambio, en el sur de Francia y en Portugal es de tipo monofásico en agosto (Rioux y col., 1970; Pires, 1985). Lo mismo sucede en Salamanca (Encinas Grandes y col., 1988), Cáceres (Rosado y col., 1995) y Madrid (Gálvez y col., 2010b).

Los hábitos de picadura de los flebotomos son crepusculares, comienzan con la puesta del sol y se prolongan durante las primeras horas de la noche, siempre y cuando la temperatura sea superior a los 17-18°C, no llueva y el viento permanezca en calma (Killick-Kendrick, 1999; Lucientes y col., 2005).

Los hábitat de los flebotomos varían desde los típicos de selva húmeda hasta los de regiones muy áridas. Su distribución queda restringida a zonas con temperaturas medias diurnas de 20°C. Se han localizado principalmente entre el nivel del mar y los 1500 m, aunque algunas especies como *Phlebotomus rupester* en Afganistán se desarrollan a 3300 m de altitud (Killick-Kendrick, 1999).

La base de la **alimentación** es, en ambos sexos, a partir de recursos naturales azucarados como la savia y el néctar de las plantas y ciertas secreciones producidas por algunos insectos (Killick-Kendrick, 1999). Sólo las hembras son hematófagas, aportando la ingesta de sangre los nutrientes necesarios para la producción de una nueva puesta (Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008). De forma insólita, las hembras de algunas especies son capaces de producir huevos viables sin necesidad de ingerir sangre (autogenia) (Montoya-Lerma, 1992; Brazil y Oliveira, 1999) e incluso sin necesidad de aparearse con los machos (partenogénesis) (Brazil y Oliveira, 1999). Una vez alimentadas, las hembras buscan microhábitat húmedos donde reposar unos días antes de localizar un lugar donde realizar la puesta (Miró y Molina, 2006).

La digestión de la sangre y la maduración de los huevos son procesos paralelos que determinan el **ciclo gonotrófico**, periodo comprendido entre una ingesta de sangre y la siguiente, y su duración nunca es inferior a seis días. La mayoría de los flebotomos son concordantes gonotróficos, es decir, efectúan una ingesta de sangre por oviposición.

Las especies vectoras de *L. infantum* en nuestro entorno son **antropozoófilas**, con una mayor preferencia por el ganado y por los perros que por el humano (Miró y Molina, 2006). Además el **fototropismo** es positivo en *P. perniciosus* por lo que es fácil capturarlo con trampas luminosas.

En cuanto a la **etología** de estos insectos, hay picadores endo o exofílicos, según si reposan dentro o fuera de las casas hasta la maduración de los huevos (Munstermann, 2005). De *P. perniciosus* se sabe que es endofílico, entra en las habitaciones, pica, reposa un corto periodo de tiempo en ellas y regresa a sus refugios naturales.

La longevidad de los flebotomos se determina de forma indirecta examinando las cicatrices dejadas en las ovarias por cada ciclo gonotrófico (Dye y col., 1987). En cuanto a la **esperanza de vida** de estos insectos, hay estudios en los que se recapturaron hembras de *P. ariasi* 28 días después de haber ingerido sangre (Killick-Kendrick y col., 1984).

La dispersión y alcance de vuelo de los flebotomos está en relación directa con la disponibilidad y abundancia de hospedadores vertebrados de los que alimentarse y con la existencia de lugares de reposo y puesta. Lo habitual es que no se desplacen más allá de 200-400 m, sin embargo la máxima distancia a la que se ha recapturado una hembra de flebotomo fue de 2200 m (Killick-Kendrick y col., 1984). La actividad de los flebotomos cesa a velocidades del viento cercanas a los 2 m/s (Killick-Kendrick, 1983). La escasa movilidad de estos insectos determina el hecho de que junto a zonas de alta prevalencia, existan otras muy próximas con un número muy inferior de casos, lo cual explica la aparición de focos endémicos aislados (Ashford, 2000).

I.2.1.2.1. Ciclo biológico

Los flebotomos son insectos holometábolos, con una fase de huevo, cuatro estadios larvarios terrestres, una pupa sésil y una fase adulta (Figura I.7).

No se puede establecer un periodo de tiempo exacto para la duración de las diferentes fases del ciclo biológico del flebotomo ya que está influenciado por diferentes factores, entre los que destaca la temperatura (Killick-Kendrick, 1999). El **periodo de preoviposición**, tiempo que transcurre entre la ingesta de sangre y la oviposición, es de 4-6 días. El **periodo de incubación** de los huevos es de unos 5-10 días tras la oviposición. El **desarrollo de los estadios larvarios** dura unas 3-4 semanas hasta la pupación. El **desarrollo pupal**, tiempo que tardan en emerger los adultos después de haberse formado las pupas, es de unos 10 días (Molina, 1991; Killick-Kendrick, 1999).

El ciclo completo, desde la ingesta de sangre del flebotomo hasta la aparición de los primeros adultos, transcurre en unas 6 semanas (Munstermann, 2005).

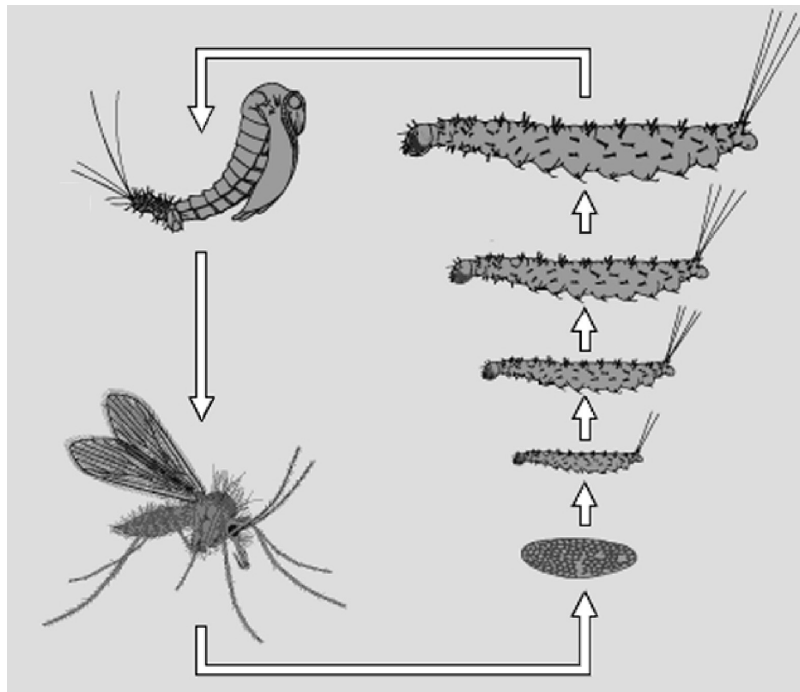


Figura 1.7. Ciclo vital de un flebotomo (Tomado de "The Wellcome Trust", 2000).

El **huevo** tiene aspecto fusiforme con ambos extremos redondeados y una superficie coriónica adornada por crestas y entrantes que configuran patrones ornamentales de gran valor taxonómico (Munstermann, 2005). Es muy sensible a la desecación. Para realizar la puesta, las hembras grávidas son atraídas a un determinado lugar por ciertos constituyentes físicos y químicos del sustrato (Killick-Kendrick, 1999). El sustrato debe estar húmedo para que se inicie la puesta (Munstermann, 2005). Ésta se realiza en lugares arenosos, en penumbra, con humedad relativa alta, temperatura constante y con abundante materia orgánica que servirá de alimento para las futuras larvas (Sharma y Singh, 2008). Cada oviposición consta de un promedio de 20-50 huevos (Munstermann, 2005).

Las **larvas**, que pasan por cuatro estadios separados por sus correspondientes mudas, miden entre 1 y 3 mm. Las larvas se desplazan muy despacio, en general son lucífugas, soportan bien la humedad intensa del sustrato y son menos sensibles a la desecación que los huevos debido a la presencia de una gruesa cutícula esclerotizada (Munstermann, 2005). El hábitat terrestre de las larvas hace que se hayan identificado una gran variedad de biotopos como madrigueras, grietas de muros, establos, corrales, jardines, sótanos, zanjas, alcantarillas, hendiduras del terreno, ruinas, minas y vertederos (Miró y Molina, 2006).

La **pupa** es sésil, y se fija verticalmente por su extremo abdominal a la superficie del sustrato mediante los restos del tegumento del último estadio larvario (Munstermann, 2005). Son más resistentes a la desecación que las larvas.

El **adulto** mide de 2 a 3 mm, es amarillento y tiene todo el cuerpo recubierto de una pilosidad muy densa. Las alas en reposo se disponen formando un ángulo de 45° respecto al eje corporal (Miró y Molina, 2006). El vuelo es silencioso y su desplazamiento lo efectúan a modo de pequeños saltos. Tienen una corta proboscis y un aparato bucal picador-chupador con las piezas bucales completas sólo en las hembras. El macho posee una potente armadura genital que le permite sujetarse a la hembra durante la fecundación (Munstermann, 2005; Sharma y Singh, 2008).

1.2.1.3. El reservorio

El perro es sin duda el principal reservorio del ciclo doméstico de la infección por *L. infantum*, debido al elevado número de individuos presentes en el nicho ecológico y a su estrecha relación con el vector (Alvar y col., 2004). Existe también un ciclo selvático de la infección por *L. infantum* que es mantenido por cánidos silvestres como el zorro, el lobo o el chacal (Gramiccia y Gradoni, 2005). En la Península Ibérica se ha denunciado la infección por *L. infantum* en carnívoros silvestres tales como lobos, zorros, lince, ginetas, mangostas o tejones (Marín Iniesta y col., 1982; Abranches y col., 1983; Abranches y col., 1984; Alvar y col., 1990; Zárata y col., 2000; Portús y col., 2002; Sobrino y col., 2008). Sobrino y col. (2008) sugieren que la alta proporción de carnívoros silvestres infectados en España (16,12% mediante PCR), incluso en áreas no endémicas como la región Cantábrica, sería capaz de mantener el ciclo selvático de la leishmaniosis canina (Lcan). El zorro podría presentarse como el eslabón entre ambos ciclos por su preferencia a vivir cerca de las poblaciones humanas, pudiendo actuar como reservorio secundario (Rioux y col., 1968; Aisa y col., 1991; Mancianti y col., 1994; Fisa y col., 1999; Sobrino y col., 2008). La prevalencia encontrada en zorros mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en trabajos realizados en España y en el sur de Italia, arroja valores que van desde un 40 hasta un 75% (Criado-Fornelio y col., 2000; Dipineto y col., 2007). En cambio Sobrino y col. (2008), en el estudio mencionado anteriormente, observan un porcentaje de prevalencia en zorros mucho menor (14,1%). En un estudio realizado mediante PCR en muestras de sangre de lobos residentes en diferentes zoológicos de Portugal, España y sur de Francia, se ha detectado *L. infantum* (Sastre y col., 2008). Así mismo, ha sido detectada también en roedores (Bettini y col., 1980; Morillas, 1985; Fisa y col., 1999; Papadogiannakis y col., 2009), caballos (Fernández-Bellón y col., 2006), cerdos (Moraes-Silva y col., 2006), gallinas (Alexander y col., 2002), vacas (Lobsiger y col., 2010), ovejas y cabras (Fisa y col., 1999), que actuarían

como hospedadores paraténicos, aunque se desconoce su papel epidemiológico. Estudios realizados mediante xenodiagnóstico han confirmado que el gato enfermo de leishmaniosis por *L. infantum* es capaz de infectar a uno de los vectores de la Lcan presentes en la cuenca mediterránea, *P. perniciosus* (Maroli y col., 2007). La seroprevalencia estimada de la leishmaniosis felina en España arroja los siguientes valores: 1,29%-4% en la zona central (Ayllon y col., 2008; Montoya Matute y col., 2009), 3%-5,25% en el noreste (Solano-Gallego y col., 2007; Tabar y col., 2008b) y 25,7% en el sur (Martín-Sánchez y col., 2007). A la vista de estos datos se debe plantear una reflexión sobre el papel que juega el gato ya que algunos autores apuntan que, lejos de ser un hospedador meramente accidental, podría comportarse como un hospedador secundario de la enfermedad en áreas donde la Lcan es endémica (Martín-Sánchez y col., 2007; Solano-Gallego y col., 2007; Maia y col., 2008; Diakou y col., 2009; Maia y col., 2009b; Montoya Matute y col., 2009).

1.2.1.3.1. Factores de riesgo

La mayoría de los estudios epidemiológicos llevados a cabo sobre la Lcan se basan en estudios de seroprevalencia que valoran exclusivamente la respuesta humoral del perro. Cabe destacar que con el uso exclusivo de pruebas inmunológicas, la tasa de infección obtenida en el perro estaría sobreestimada en zonas endémicas, ya que evidencia junto con los casos de enfermedad, los casos de perros infectados pero clínicamente sanos (Cabral y col., 1998). Se han realizado numerosos estudios epidemiológicos que ponen de manifiesto aquellos factores que predisponen a la infección por *L. infantum*. Determinadas características de la población canina (edad, raza, sexo, actividad, hábitos de vida y dietéticos), una predisposición genética, o situaciones de inmunosupresión, pueden aumentar el riesgo de contraer la enfermedad (Solano-Gallego y col., 2009).

Aunque diversos estudios evidencian una mayor seroprevalencia en los machos (Fisa y col., 1999; Zaffaroni y col., 1999; Zivicnjak y col., 2005), el sexo de los perros por lo general no se considera un factor determinante (Amusátegui y col., 2003; Miró y col., 2007b; Dos-Santos y col., 2008; Martín-Sánchez y col., 2009; Gálvez y col., 2010a). Sin embargo Zivicnjak y col. (2005) sostienen que las diferencias encontradas en los valores de seroprevalencia de machos (19,31%) y hembras (9,23%) no se deben a diferencias en los hábitos de vida del animal, ya que la población canina estudiada se hallaba en las mismas condiciones. Estos autores sugieren que un incremento de la mortalidad en las hembras durante la gestación y la lactancia, junto con la presencia de diferencias genéticas entre sexos que condicionan la elaboración de una respuesta inmune eficaz, podrían explicar las diferencias encontradas. Apoyando esta hipótesis Travi y col. (2002) sostienen que los altos niveles de testosterona que

presentan los machos promueven el desarrollo de la infección en cricetos, debido a que tienen un efecto sobre la respuesta inmune del animal.

Se han detectado prevalencias más elevadas en perros de raza Boxer, Cocker Spaniel, Doberman, Pastor Alemán y Rottweiler (Abranches y col., 1991; Franca-Silva y col., 2003; Miranda y col., 2008). En cambio el Podenco Ibicenco, estudiado en un área endémica de Lcan (Ibiza, Baleares), se considera como una raza más resistente a la infección pues presentan pocos casos con manifestaciones clínicas de la enfermedad (Solano-Gallego y col., 2000; Chicharro y col., 2005). Por otro lado, también hay estudios que no apoyan la hipótesis de susceptibilidad a la Lcan de ciertas razas (Fisa y col., 1999; Leontides y col., 2002; Amusátegui y col., 2003).

La edad es un factor de riesgo ampliamente documentado en la Lcan (Abranches y col., 1991; Amela y col., 1995; Cardoso y col., 2004; Zivicnjak y col., 2005; Miró y col., 2007b; Miranda y col., 2008; Alonso y col., 2009; Martín-Sánchez y col., 2009; Gálvez y col., 2010a). Se ha advertido una distribución bimodal de la enfermedad presentándose dos elevaciones en la seroprevalencia, una en perros jóvenes y otra en perros mayores de siete años (Abranches y col., 1991; Amela y col., 1995; Zivicnjak y col., 2005; Miranda y col., 2008; Gálvez y col., 2010a). El incremento de la seroprevalencia de la Lcan en perros jóvenes podría estar relacionado con la inmadurez inmunitaria que presentan, haciéndoles más vulnerables a la infección en el primer o segundo año de vida. La segunda elevación observada en los perros de mayor edad puede explicarse, bien por la acumulación del tiempo de exposición al vector, o bien porque cuando el sistema inmune se deteriora, con la edad u otras enfermedades concomitantes, los animales que presentan una infección latente (adquirida seguramente en los primeros meses de vida) pueden sufrir una reactivación de la misma (Cabral y col., 1998; Miranda y col., 2008; Gálvez y col., 2010a).

El aumento del tiempo de exposición al vector implica un incremento en el riesgo de ser infectado y está directamente relacionado con **los hábitos de vida** del perro (tiempo que permanece en el exterior de la vivienda expuesto a la picadura del flebotomo). Aquellos perros que desempeñan actividades que impliquen pasar más tiempo al aire libre- como los perros de guarda, pastoreo o caza - serán los que estén más expuestos a padecer la infección (Amela y col., 1995; Acedo Sánchez y col., 1996; Amusátegui y col., 2004; Solano-Gallego y col., 2006; Martín-Sánchez y col., 2009; Gálvez y col., 2010a). **El peso** se relaciona con un mayor riesgo a la infección, bien porque un aumento del mismo conlleva un incremento de la superficie corporal expuesta a la picadura del vector, bien porque los perros de tallas mediana y grande, que suelen tener actividades de trabajo asociadas, permanecen largos periodos de

tiempo al aire libre (Alonso y col., 2009; Martín-Sánchez y col., 2009; Gálvez y col., 2010a). Según el **hábitat** del perro, se ha documentado que aquellos que viven en zonas rurales o periurbanas tienen más riesgo de entrar en contacto con la infección (Martínez-Cruz y col., 1990; Nieto y col., 1992a; Celaya, 1993; Castañeda y col., 1999; Solano-Gallego y col., 2006).

La **malnutrición** se ha descrito como un factor de riesgo que potencia el desarrollo de LVH (Anstead y col., 2001) y puede considerarse en el perro un factor predisponente (ej. animales vagabundos).

Se ha documentado la **predisposición genética** de los perros que porten ciertos alelos del gen *Slc11c1* (*Solute carrier family 11 member a1*) o del gen *MHCII*, ya que tienen mayor susceptibilidad de padecer la infección por *Leishmania* (Quinnell y col., 2003; Sánchez-Robert y col., 2008).

I.2.1.4. Vías de transmisión

I.2.1.4.1. Transmisión vectorial

El éxito de la infección por *Leishmania* en el hospedador vertebrado depende del equilibrio establecido entre el flebotomo y el patógeno en el ciclo intravectorial. El parásito se tendrá que enfrentar en el tubo digestivo del flebotomo a barreras naturales, físicas o químicas, que tendrá que superar.

Los flebotomos insertan parte de su aparato bucal en la epidermis del hospedador vertebrado y a modo de sierra, producen una pequeña herida por donde la sangre fluye formando un pequeño acúmulo del que se alimentan (Lewis, 1987; Bates, 2007). Tras la picadura a un hospedador vertebrado infectado, el flebotomo puede ingerir sangre con macrófagos parasitados, lo que desencadena la diferenciación y multiplicación del parásito íntegramente en el tubo digestivo del insecto (Figura I.8). La ingesta de sangre llega a la región abdominal del flebotomo inundando su tubo digestivo medio. Allí es englobada por la membrana peritrófica, una malla formada por quitina, proteínas y glicoproteínas, secretada por el epitelio intestinal del flebotomo en las primeras 4 horas (Secundino y col., 2005). En el interior de esta membrana se produce la ruptura de los macrófagos y la liberación de los amastigotes. En primer lugar los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos de pequeño tamaño, corto flagelo y movimientos lentos (Kamhawi, 2006). Una vez diferenciados, los promastigotes procíclicos se multiplican activamente durante las primeras 24-48 horas. El hecho de que estas formas se encuentren en el interior de la membrana peritrófica, les protege inicialmente del

ataque de las enzimas digestivas del flebotomo. Pero la membrana es permeable a las enzimas proteolíticas secretadas en el espacio ectoperitrófico y, a partir de las primeras 18-48 horas, son capaces de atravesar dicha barrera para digerir la ingesta de sangre (Sacks y Kamhawi, 2001). Este ataque enzimático crea un ambiente hostil para la supervivencia del parásito, estimándose una mortalidad del 50% de ellos (Pimenta y col., 1997). Se ha descrito que la secreción de fosfoglicanos por parte del parásito le protege de dichas enzimas digestivas (Kamhawi, 2006). Además, la actividad enzimática global junto con la digestión en el tubo digestivo medio, se reduce cuando la ingesta de sangre contiene parásitos específicos de ese vector (Daba y col., 1997b, a). Al cabo de 2 ó 3 días, los promastigotes procíclicos disminuyen su replicación e inician su diferenciación transformándose en nectomonas, promastigotes con un cuerpo más fino y alargado y con una gran movilidad (Bates, 2007). Estas formas migratorias se agolpan en la parte anterior de la membrana peritrófica. Gracias a la acción de las quitinasas, bien secretadas por el parásito (Schlein y col., 1991; Shakarian y Dwyer, 2000), o bien endógenas del flebotomo (Ramalho-Ortigao y col., 2005), se produce la ruptura de dicha membrana. Es entonces cuando las nectomonas evaden el confinamiento de la membrana peritrófica, se desplazan hacia la región torácica del intestino medio del flebotomo y se anclan, a través del lipofosfoglicano de su superficie, a las células que tapizan el epitelio intestinal, evitando así su expulsión con las heces (Sacks y Kamhawi, 2001). Además se ha descrito la secreción de un neuropéptido por parte del parásito capaz de detener la peristalsis del intestino medio y posterior, lo que facilita su supervivencia (Vaidyanathan, 2004, 2005). Entre los días 4 y 7, las nectomonas alcanzan las proximidades de la válvula estomodeal y se diferencian en promastigotes más cortos llamados leptomonas, que son capaces de reanudar la multiplicación (Gossage y col., 2003). La activa división de las leptomonas da lugar a una infección masiva localizada en la parte anterior del intestino medio del flebotomo (Kamhawi, 2006). Las leptomonas son las responsables de la secreción de un tapón gelatinoso de fosfoglicanos (PSG, *promastigote secretory gel*) que bloquea la parte anterior del tubo digestivo medio, evento que parece necesario para que se lleve a cabo la transmisión (Rogers y col., 2002). Algunas leptomonas/nectomonas se adhieren a la cutícula de la válvula estomodeal y entre los días 5 y 7 se diferencian en haptomonas (Killick-Kendrick y col., 1974), organizadas en anillos concéntricos que bloquean la válvula estomodeal (Kamhawi, 2006). Estos promastigotes producen quitinasas que deterioran la válvula estomodeal, otro de los fenómenos claves en la transmisión (Schlein y col., 1992; Volf y col., 2004). Al mismo tiempo, algunas leptomonas embebidas en el tapón de PSG se diferencian en promastigotes infectantes metacíclicos (metacicloogénesis) (Rogers y col., 2002).

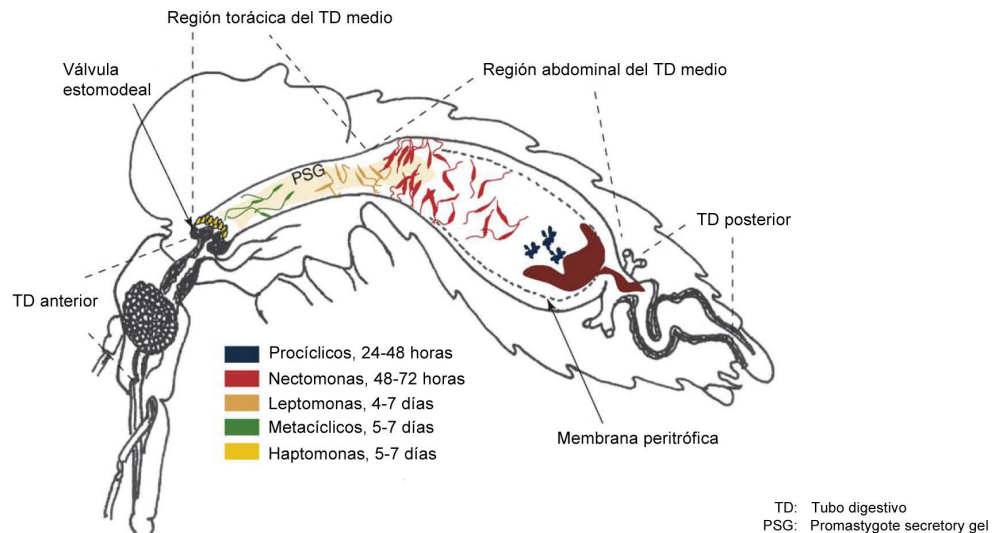


Figura I.8. Ciclo intravectorial de *Leishmania* spp. Tomado de Kamhawi (2006).

Se han barajado diferentes hipótesis a lo largo del tiempo en relación con los posibles mecanismos de transmisión en el transcurso de la picadura del flebotomo, que se enumeran a continuación (Bates, 2007):

- Regurgitación de los promastigotes metacíclicos debido al tapón de promastigotes que obstruyen el canal alimenticio de los flebotomos (Bacot y Martin, 1914).
- Inoculación de los promastigotes presentes en la proboscis del flebotomo. Los parásitos serían inoculados en el mismo instante en que la proboscis entra en contacto con la piel, antes de ingerir sangre (Killick-Kendrick y col., 1977).
- Deterioro de la válvula estomodeal del flebotomo, causado por quitinasas expresadas por el parásito. Altera el mecanismo de alimentación normal del flebotomo, ya que provoca una descoordinación entre las bombas cibarial y faríngea que favorece el reflujo de los parásitos durante la picadura. Además obliga al insecto a realizar repetidos intentos y a prolongar la duración de la picadura (Schlein y col., 1992; Volf y col., 2004).
- Regurgitación de los promastigotes metacíclicos debido al tapón de PSG que dificulta la ingestión de sangre. El tapón de PSG conteniendo promastigotes metacíclicos es regurgitado. La expulsión de los promastigotes metacíclicos junto con el tapón de PSG y la saliva del flebotomo, favorece la transmisión (Rogers y col., 2002; Rogers y col., 2004).

Se ha sugerido que ciertos ectoparásitos, como las garrapatas (Coutinho y col., 2005; Dantas-Torres y col., 2010; Paz y col., 2010), o las pulgas (Coutinho y Linardi, 2007; Ferreira y col., 2009), se podrían comportar como vectores de la enfermedad, aunque en ningún caso está confirmado (Otranto y Dantas-Torres, 2010). Por el momento se

pueden considerar hallazgos asociados a la variedad de hospedadores infectados por diversos patógenos de los que estos artrópodos hematófagos pueden alimentarse.

I.2.1.4.2. Otras formas de transmisión

Se han propuesto otras formas de transmisión diferentes a la vectorial, por transmisión congénita o a través del contacto directo o intercambio de fluidos corporales con individuos infectados (Quinnell y Courtenay, 2009). La transmisión congénita ha sido demostrada por la detección de ADN de *Leishmania* mediante PCR en varios tejidos de cachorros nacidos de una perra infectada experimentalmente (Rosypal y col., 2005). No obstante, otros autores no observan transmisión vertical en perros infectados de forma natural (Andrade y col., 2002). Las transfusiones (Owens y col., 2001; de Freitas y col., 2006; Tabar y col., 2008a), trasplantes de órganos (Antinori y col., 2008) o el uso compartido de jeringas entre adictos a drogas por vía parenteral (Alvar y col., 1997; Cruz y col., 2002a; Molina y col., 2003) han sido documentadas como una alternativa a la transmisión natural de *Leishmania*. Tanto la existencia de parásitos en el semen como la transmisión sexual de la leishmaniosis, han sido corroboradas en Brasil en el 58% de los perros sanos que se aparearon con perros naturalmente infectados (Silva y col., 2009). En otras ocasiones no es fácil explicar cómo ha sucedido la transmisión, como en el brote de leishmaniosis canina acontecido en una perrera de un condado de Nueva York donde jamás se había detectado su presencia y sólo se conocen flebotomos considerados no vectores (Enserink, 2000; Gaskin y col., 2002; Ostfeld y col., 2004; Duprey y col., 2006). La hipótesis más plausible que se está barajando en la aparición de dicho brote es la transmisión por mordedura, que ya ha sido documentada para *Babesia gibsoni* (Birkenheuer y col., 2005; Yeagley y col., 2009). Actualmente no hay evidencia de que estas formas alternativas de transmisión sean capaces de mantener la infección en ausencia de flebotomos (Quinnell y Courtenay, 2009).

I.2.1.5. Poder infectante

Para comparar la capacidad infectante que presentan los perros infectados, enfermos o clínicamente sanos, sobre los flebotomos, Quinnell y Courtenay (2009) hacen una revisión exhaustiva de todos los estudios de xenodiagnóstico realizados con ese fin (Molina y col., 1994; Guarga y col., 2000a; Travi y col., 2001; Courtenay y col., 2002; da Costa-Val y col., 2007; Michalsky y col., 2007; Vercosa y col., 2008). Se observa que todos los perros infectados (enfermos o clínicamente sanos) infectan a los flebotomos, aunque la tasa de infectividad es mayor en los primeros (OR =3,09, 95% IC:1,96-4,88, P<0,0001). La tasa de infectividad de los perros es mayor en Europa (Molina y col., 1994; Guarga y col., 2000a) que en Sudamérica (Travi

y col., 2001; Courtenay y col., 2002; da Costa-Val y col., 2007; Michalsky y col., 2007; Vercosa y col., 2008) (OR=8,02, 95% IC:1,92-33,5, P=0,004). Este hecho podría indicar que la capacidad vectorial de *P. perniciosus* es más eficaz cuando se compara con *Lutzomyia longipalpis*, el principal vector de *L. infantum* (= *L. chagasi*) en el continente americano. La infectividad del perro aumenta con la gravedad clínica de la enfermedad, con un incremento de los niveles de anticuerpos y bajos niveles de células T cooperadoras CD4+ (Guarga y col., 2000b; Courtenay y col., 2002; da Costa-Val y col., 2007); y en cambio disminuye después del tratamiento (Molina y col., 2000; Vergel y col., 2006; Ribeiro y col., 2008). Por otro lado la proporción de flebotomos infectados es similar tanto en perros enfermos como en perros infectados clínicamente sanos (Quinnell y Courtenay, 2009).

I.2.1.6. Distribución geográfica

La Lcan abarca alrededor de 50 de los 88 países donde la leishmaniosis humana está presente y afecta fundamentalmente a tres zonas geográficas: Brasil, China y la cuenca mediterránea. Hoy en día la Lcan, cuyo principal reservorio es el perro, ocasiona serios problemas de salud pública en Brasil donde se denuncian más de 3500 casos humanos al año (Dujardin y col., 2008). Está causada principalmente por *L. infantum* (= *L. chagasi*) (Dantas-Torres, 2006). El perro también puede estar infectado de manera ocasional por otras especies de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania panamensis*) (Dereure y col., 1991; Llanos-Cuentas y col., 1999; Reithinger y Davies, 1999; Madeira Mde y col., 2005; Hassan y col., 2009; Solano-Gallego y col., 2009), aunque parece ser que éstas no tienen relevancia epidemiológica en la transmisión al ser humano (Lemrani y col., 2002; Dantas-Torres, 2007). Tradicionalmente se ha considerado que *L. infantum* se propagó de Europa a América Latina a través de los perros que acompañaban a los conquistadores, emergiendo *L. longipalpis* como vector del parásito (Killick-Kendrick, 1985; Rioux y col., 1990; Mauricio y col., 2000; Tuon y col., 2008). Actualmente existe una segunda hipótesis que sostiene la existencia de un ancestro del parásito en América Latina (Lainson y Rangel, 2005; Shaw, 2006).

En Europa, se estima que 2,5 millones de perros de los 15 millones que viven en los países de la cuenca mediterránea están infectados, con una prevalencia del 16,7% en promedio (Moreno y Alvar, 2002). Los valores nacionales de prevalencia media en los países considerados tradicionalmente como endémicos ha sido resumida como sigue por Dujardin y col. (2008): **Portugal** 20% (Cortes y col., 2007), **España** 8-9% (Miró y Molina, 2006), **Francia** 4-20% (Centro Nacional de Referencia para las Leishmaniosis, Montpellier), **Italia peninsular** 15% (Gradoni,

1999) e Italia continental 4% (Maroli y col., 2008), Grecia 25% (Papadopoulou y col., 2005), Chipre 20% (Centro Nacional de Referencia para la Salud Animal, Nicosia) y Turquía 15,7% (Universidad Ege, Facultad de Medicina, Departamento de Parasitología, Esmirna). Los vectores probados de la Lcan, pertenecientes al género *Phlebotomus* y al subgénero *Larroussius*, son los siguientes: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus perfiliewi* y *Phlebotomus tobbi* (Killick-Kendrick, 1999). La distribución geográfica de la Lcan y de sus vectores se muestra en la Figura I.9.

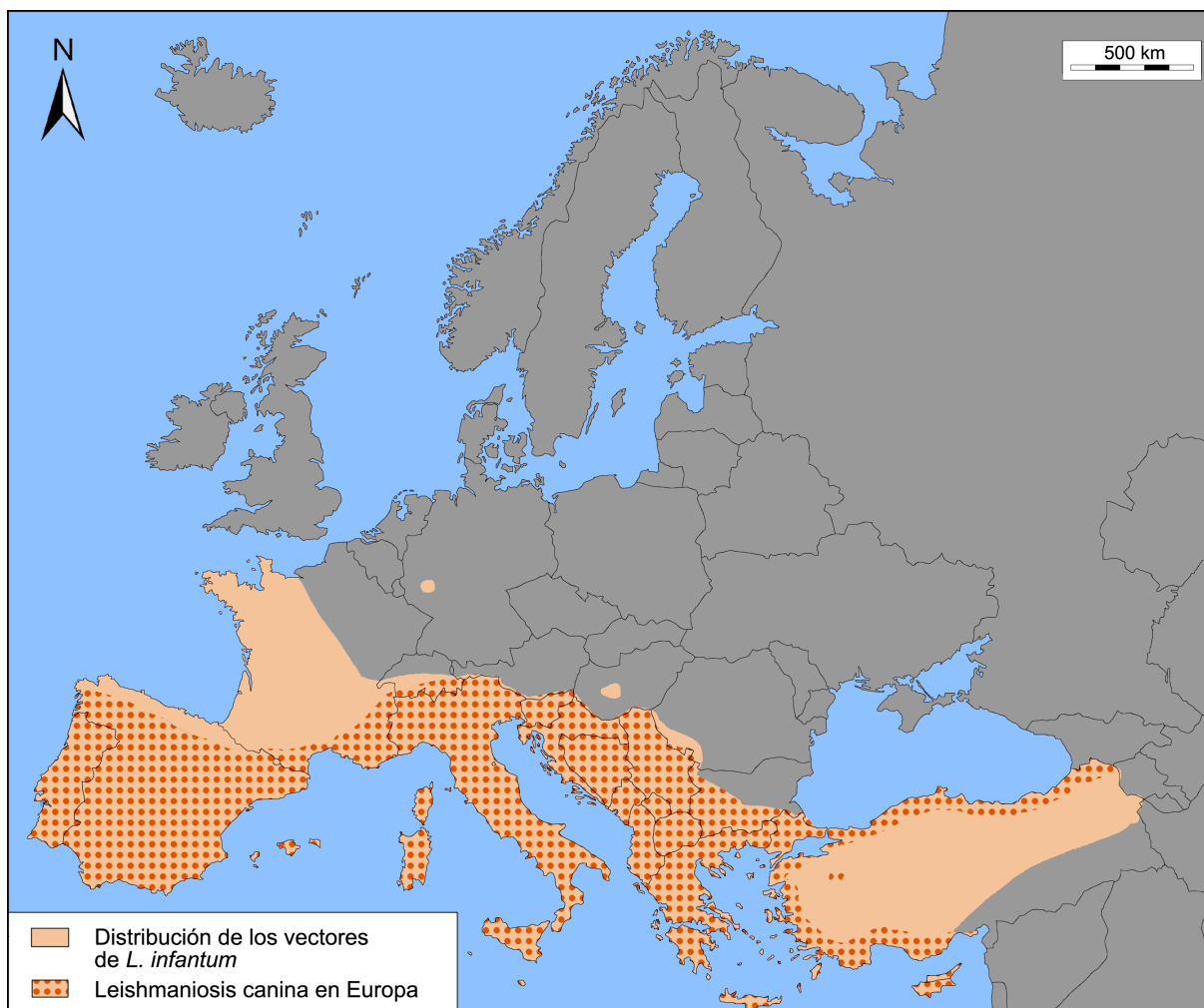
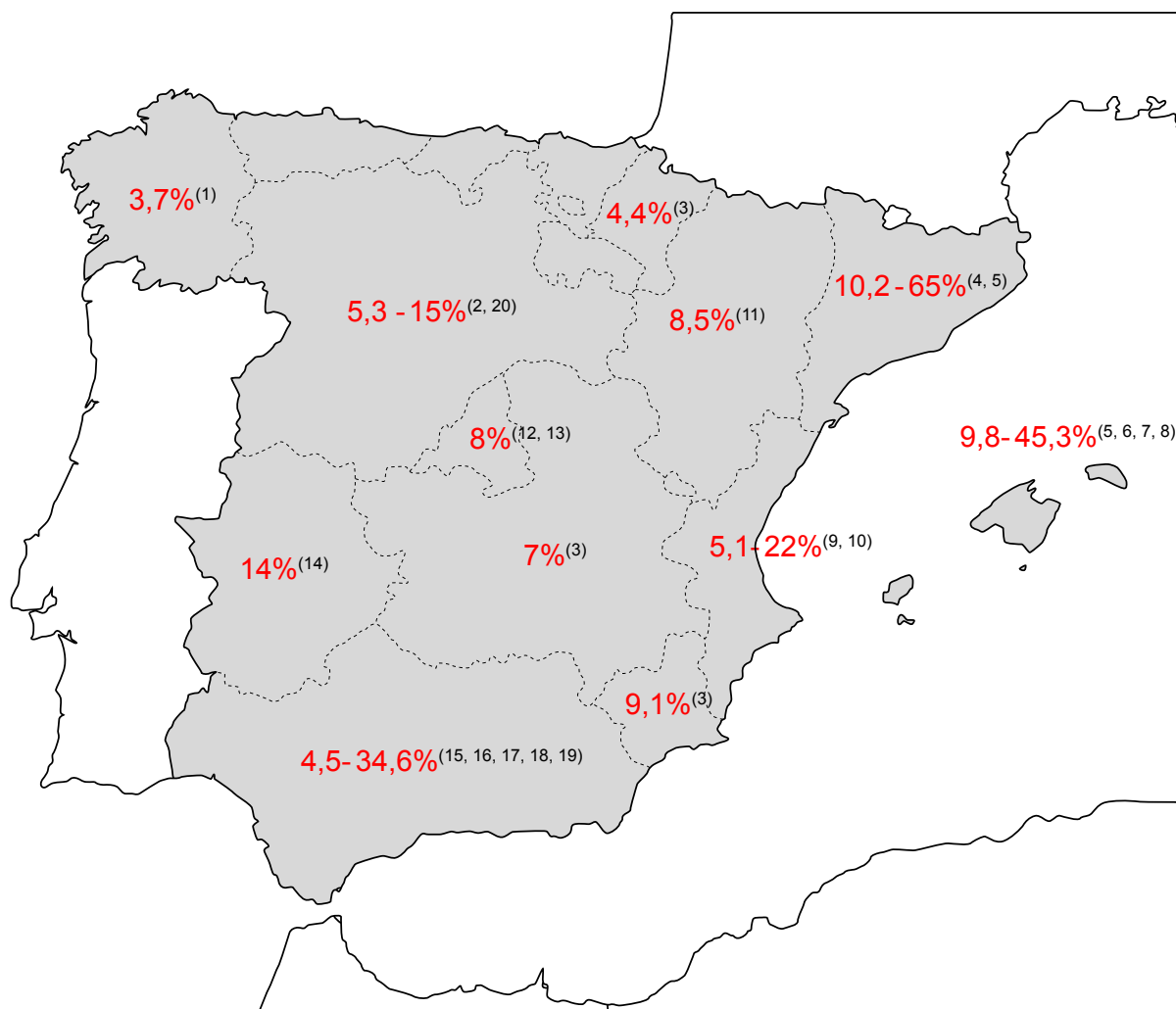


Figura I.9. Distribución de los vectores de *L. infantum* y de la Lcan en la cuenca mediterránea. (J. Barón y R. Gálvez).

En España se ha denunciado la presencia de la Lcan en prácticamente todo su territorio, a excepción de las provincias de la cornisa cantábrica y de las islas Canarias. Los datos de seroprevalencia registrados por Comunidades Autónomas en la Península Ibérica y Baleares se muestran en la Figura I.10 (Miró y Molina, 2006):



(1) Amusátegui y col. (2004); (2) Encinas Grandes y col. (1988); (3) Programa de Control y Prevención, 1991 (Ministerio de Sanidad y Consumo); (4) Fisa y col. (1999); (5) Solano-Gallego y col. (2006); (6) Chicharro y col. (2004); (7) Solano-Gallego (2001); (8) Pujol y col. (2005); (9) Arnedo Pena y col. (1994); (10) Alonso y col. (2009); (11) Castillo Hernández y col. (1985); (12) Miró y col. (2007b); (13) Gálvez y col. (2010a); (14) Nieto y col. (1992a); (15) Martín-Sánchez y col. (2009); (16) Morillas y col. (1996); (17) Lepe y col. (2000); (18) Martínez-Cruz y col. (1990); (19) Sanchís Marín y col. (1997); (20) Couto y col. (2010).

Figura I. 10. Seroprevalencia de la Lcan por Comunidades Autónomas en la Península Ibérica y Baleares. Adaptado de Miró y Molina (2006) (J. Barón y R. Gálvez).

I.2.2. INMUNOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR *L. infantum*

El tipo de respuesta inmune mediada frente a la infección por *L. infantum* determina las diferentes formas clínicas de la Lcan. Los macrófagos que portan los amastigotes fagocitados, desde la piel hasta los ganglios linfáticos, exponen los antígenos a los linfocitos T, que una vez activados migran por vía linfohematógena a la zona lesionada, favoreciendo la respuesta inmune. Existen dos tipos de respuesta mediada por los linfocitos T, una respuesta celular Th1 asociada a la inmunidad protectora y otra respuesta humoral Th2 asociada a la progresión o susceptibilidad de la enfermedad (Baneth y col., 2008). La respuesta Th1

protectora induce la producción de interferón (IFN), interleuquina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TFN), potentes activadores de los macrófagos capaces de producir en un ambiente intracelular el óxido nítrico (NO) letal para los amastigotes (Santos-Gomes y col., 2002). La respuesta Th2 no protectora induce la aparición de las interleuquinas 4 (IL-4) y 10 (IL-10) que promueven la estimulación de los linfocitos B. Este hecho origina una hipergammaglobulinemia inespecífica mediada por células plasmáticas, provocando la formación masiva de anticuerpos anti-*Leishmania* no protectores (Guarga y col., 2000b; Noben-Trauth y col., 2003). Esta hipergammaglobulinemia favorece la diseminación del parásito ya que durante la opsonización del amastigote los anticuerpos facilitan su fagocitosis por parte del macrófago, requisito indispensable para que el parásito sobreviva (Slappendel, 1988; Goto y Prianti, 2009).

Las formas clínicas manifestadas tras la infección por *L. infantum* en el perro dependen del balance en la respuesta Th1/Th2 (Baneth y col., 2008). De este modo, el cómputo final de ambas respuestas originará una gran diversidad de formas clínicas que van desde una ausencia total de signos clínicos, hasta cuadros clínicos muy graves (Solano-Gallego y col., 2009).

En áreas de alta endemicidad los estudios seroepidemiológicos revelan la enfermedad en un 5-10% de los perros, permaneciendo el resto (90-95%) clínicamente sanos. Hay que tener en cuenta que estos perros aparentemente sanos se pueden dividir a su vez en dos subgrupos, alrededor de un tercio sin infectar y dos tercios que sí lo están. Dentro del grupo de animales infectados, el 68% son susceptibles a la diseminación del parásito y el 32% son perros resistentes. Los individuos susceptibles, que presentan una alta respuesta humoral y ausencia de respuesta celular, probablemente desarrollarán una leishmaniosis clínica. En cambio los individuos resistentes serán capaces con el tiempo de controlar inmunológicamente la infección mediante una respuesta celular eficaz (Solano-Gallego y col., 2009). Sin embargo, la infección subclínica depende de un equilibrio, que factores como la inmunosupresión o la presencia de enfermedades concomitantes puede alterar, permitiendo la progresión de la enfermedad. Los perros enfermos presentan una infección crónica que bajo tratamiento puede mantenerse como una infección persistente o, en la mayoría de los casos, evolucionar a una curación clínica (Alvar y col., 2004). Los perros infectados pero clínicamente sanos y los clínicamente curados, pueden presentar excepcionalmente una curación parasitológica espontánea (Solano-Gallego y col., 2009), mantener la carga parasitaria a unos niveles insuficientes para desencadenar la enfermedad (Moreno y Alvar, 2002) o desarrollar la enfermedad (Figura I.11).

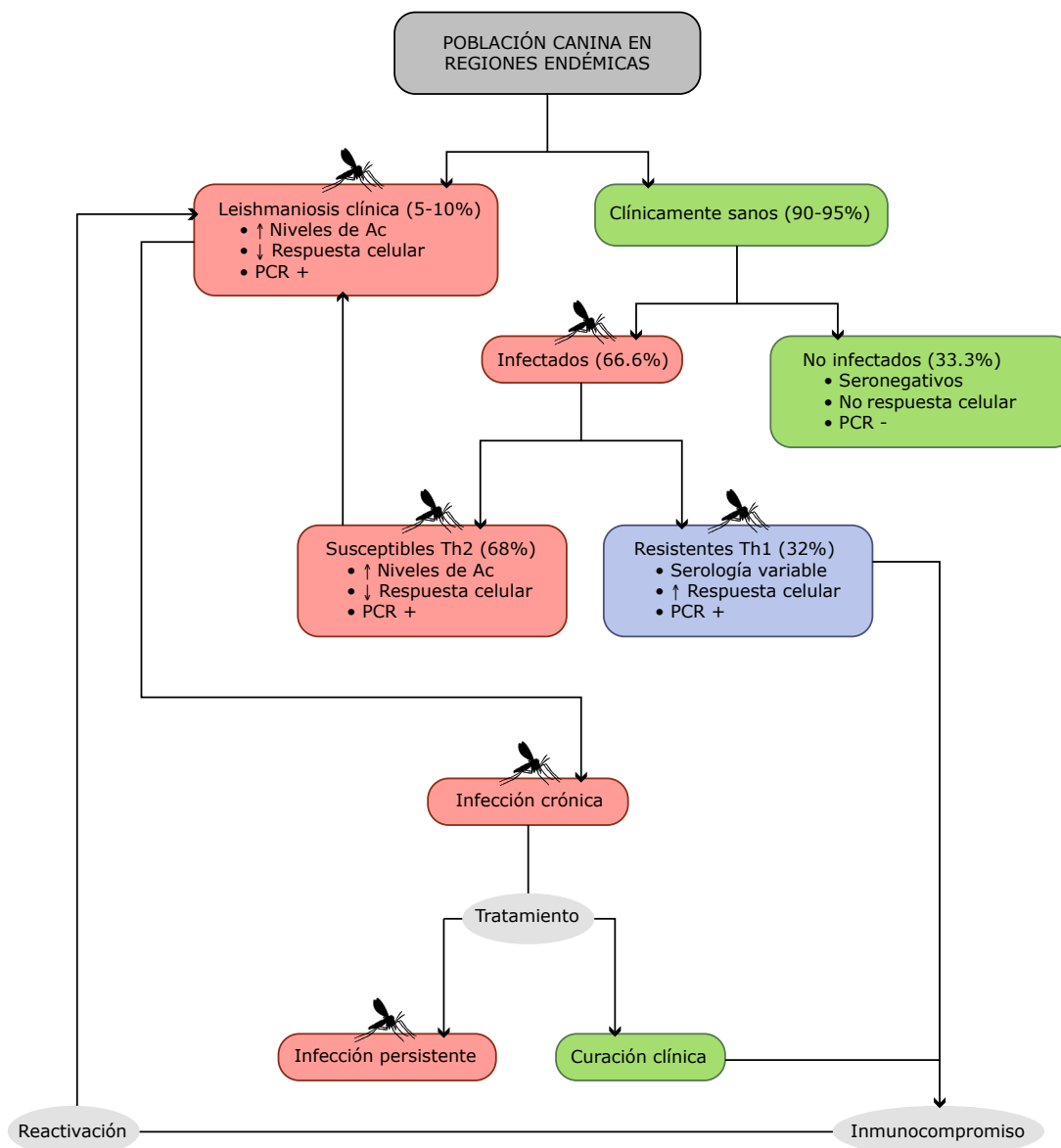


Figura I.11. Respuesta inmunitaria frente a la infección por *L. infantum* en la población canina de áreas endémicas. Las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad se esquematizan así: sanos (en verde), enfermos susceptibles (en rojo) e infectados resistentes (en azul). La silueta del flebotomo indica en qué fases el perro infectado es capaz de transmitir el parásito al vector, como ha sido demostrado ampliamente mediante xenodiagnóstico. Adaptado de Solano-Gallego y col. (2009) y Moreno y Alvar (2002) (J. Barón y R. Gálvez).

En áreas endémicas la leishmaniosis clínica representa solamente la punta del iceberg, siendo la parte “visible” los casos de la enfermedad, pero la realidad es que la mayoría de la población que está expuesta al parásito puede llegar a infectarse sin manifestar la enfermedad de forma evidente (Leontides y col., 2002; Baneth y col., 2008).

El primer elemento necesario para el establecimiento de la infección es la diseminación orgánica del parásito, propiciada por estos factores:

- **La parasitación intracelular** provoca una alteración funcional del macrófago al disminuir su capacidad fagocítica y su actividad como célula presentadora de antígenos. En última instancia ocasiona la destrucción del macrófago.
- **La respuesta inmunitaria ineficaz** se caracteriza por la ausencia de inmunidad celular y por presentar una extraordinaria respuesta humoral, responsable de la síntesis de altos niveles de inmunoglobulinas no protectoras. Bajo estas circunstancias, el parásito puede diseminarse por todo el organismo, ya que altera su capacidad defensiva.

El parásito se multiplica principalmente en los órganos hematopoyéticos (bazo, médula ósea y linfonodos), donde continúa su replicación para después extenderse al resto de los órganos (piel, hígado, riñones, aparato digestivo, ojos, articulaciones...). Una vez generalizada la infección se producen alteraciones de diferente tipo y magnitud en la práctica totalidad del organismo, dependiendo de la respuesta inmune desarrollada y del tiempo transcurrido desde el establecimiento de la infección.

Los elementos patogénicos determinantes de la infección por *L. infantum* son:

- **Producción de inmunocomplejos:** la hipergammaglobulinemia favorece el depósito de inmunocomplejos, compuestos principalmente por IgG y las fracciones C1, C2 y C4 del complemento en diversas partes del organismo (Makni y col., 1989). Estos inmunocomplejos alteran el sistema de coagulación y el flujo sanguíneo al depositarse en localizaciones orgánicas tales como vasos sanguíneos (coagulaciones intravasculares, vasculitis) (Pumarola y col., 1991; Font y col., 1994), bazo, hígado, ojos (García-Alonso y col., 1996a) o riñones (glomerulonefritis membranosa) (Poli y col., 1991; Nieto y col., 1992b; Zatelli y col., 2003). Este elemento inmunopatológico es el responsable de muchos de los signos clínicos más graves de la enfermedad.
- **Producción de infiltrados celulares:** la reacción inflamatoria, producida como respuesta del organismo a la infección por *L. infantum*, provoca la formación de un infiltrado celular que se extiende por los órganos y tejidos afectados provocando alteraciones estructurales y funcionales. Tanto el infiltrado celular como los granulomas, que se presentan en fases avanzadas de la enfermedad, están formados por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Las reacciones inflamatorias son las responsables de las lesiones cutáneas (dos-Santos y col., 2004), alteraciones digestivas, lesiones articulares y oculares.

- **Liberación de citoquinas por los macrófagos:** son responsables de los trastornos generales de la enfermedad como fiebre, adelgazamiento, astenia y atrofia muscular.

Por último, existen otros mecanismos patogénicos menos estudiados:

- **Anemia no regenerativa:** puede deberse a la formación de autoanticuerpos responsables de la destrucción de los eritrocitos.
- **Epístaxis:** parece ser que en algunos casos no se debe exclusivamente a una trombocitopenia sino que está relacionada con la formación de microlesiones vasculares (vasculitis) y ulceraciones a nivel de la mucosa nasal (Juttner y col., 2001; Petanides y col., 2008).
- **Presencia de amastigotes en las células musculares:** los depósitos de IgG provocan necrosis y atrofia muscular (Vamvakidis y col., 2000).
- **Neuropatías:** asociadas a la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en el líquido cefalorraquídeo (Viñuelas y col., 2001).

1.2.3. CUADRO CLÍNICO

El cuadro clínico es muy variable y, debido a la multiplicidad de los mecanismos patogénicos y a la individualidad de la respuesta inmunitaria, es difícil ver dos perros con los mismos signos clínicos. El periodo de incubación, que oscila entre varios meses e incluso más de un año (Rioux y col., 1979; Gaeta y col., 1994), suele retrasar la manifestación de la enfermedad más allá del primer año de vida.

El cuadro clínico, que cursa en el inicio con signos cutáneos y a medida que avanza la enfermedad aparecen manifestaciones viscerales, se caracteriza por la presencia de uno o más de los siguientes signos o grupo de signos:

- **Adelgazamiento y astenia:** la inapetencia del animal enfermo puede conllevar a la pérdida de peso (Ciaramella y col., 1997; Dos-Santos y col., 2008) que, en casos extremos, evoluciona a un cuadro de caquexia de peor pronóstico (Figura 1.12).
- **Atrofia muscular:** principalmente facial de los músculos temporales y maseteros (Koutinas y col., 1999; Vamvakidis y col., 2000; Koutinas y col., 2001). Puede complicarse con un cuadro de polimiositis crónica caracterizada por la inflamación y atrofia de los músculos debido a la presencia de infiltrados celulares y al depósito de inmunocomplejos.
- **Anemia no regenerativa:** se aprecia palidez de mucosas y está presente en alrededor de un 40% de los enfermos crónicos (Ciaramella y col., 1997; Koutinas y col., 1999).
- **Linfadenomegalia localizada o generalizada:** se caracteriza por un aumento

en el tamaño de los linfonodos y, aunque sea uno de los signos que se presenta con mayor frecuencia (Slappendel, 1988), no aporta información por sí mismo sobre la gravedad de la enfermedad (Lima y col., 2004; Mylonakis y col., 2005).



Figura I.12. Cuadro de caquexia (G. Miró).

- **Esplenomegalia:** la hipertrofia del bazo es un signo poco frecuente (< 20%) (Almeida y col., 2005). Está provocada por una alteración en su estructura vascular y por un incremento en el número de los macrófagos y monocitos presentes (Alexandre-Pires y col., 2006).
- **Hemorragias:** en mucosa nasal (epístaxis), en mucosa vexical (hematuria) o en mucosa intestinal (melena), pueden estar asociadas a ulceraciones tisulares, lesiones inflamatorias o a un defecto de la funcionalidad plaquetaria (Ciaramella y col., 2005). Se han descrito vasculitis inmunomediadas por depósitos de inmunocomplejos que contribuyen a estos procesos hemorrágicos (Pumarola y col., 1991).
- **Alteraciones intestinales:** son poco frecuentes. Dan lugar a procesos diarreicos que pueden verse acompañados de melena. Corresponden a una colitis ulcerativa granulomatosa provocada por la presencia de infiltrados celulares en la mucosa intestinal (Ferrer y col., 1991; Adamama-Moraitou y col., 2007).

- **Alteraciones hepáticas:** la presencia de parásitos en el hígado origina una hepatitis de carácter granulomatoso. Los animales afectados pueden presentar vómitos, pérdida de peso, poliuria-polidipsia, ascitis e incremento de enzimas hepáticas. Giunchetti y col. (2008a) destacan la asociación existente entre las alteraciones hepáticas y la progresión de la enfermedad.
- **Alteraciones renales:** el depósito de inmunocomplejos a nivel del glomérulo renal genera una glomerulonefritis que en sus inicios es de carácter agudo y reversible, pero a medida que la enfermedad avanza se instaura una insuficiencia renal acompañada de un incremento de urea y creatinina en sangre, pérdida de proteínas en orina y anemia (Nieto y col., 1992b; Koutinas y col., 1999; Costa y col., 2003). El fallo renal empeora el pronóstico y suele ser la causa más frecuente de muerte en la Lcan.
- **Lesiones oculares:** se asocian a inflamaciones granulomatosas o difusas por depósito de inmunocomplejos en diferentes regiones del ojo y que afectan a ambos segmentos. El segmento anterior se encuentra afectado con mayor frecuencia por afecciones como blefaritis, conjuntivitis o queratitis (Peña y col., 2000; Naranjo y col., 2005; Peña y col., 2008). El segmento posterior, aunque con menos frecuencia, sufre importantes lesiones como hemorragias retinianas, iridociclitis, coriorretinitis, uveitis o desprendimiento de retina (García-Alonso y col., 1996b). En raras ocasiones las uveitis desencadenan un glaucoma.
- **Poliartritis:** la presencia de lesiones articulares y óseas, como consecuencia del depósito de inmunocomplejos en las cavidades articulares (Wolschrijn y col., 1996), pueden manifestarse en forma de cojeras y se consideran erosivas en los estados crónicos de la enfermedad. La citología del líquido sinovial puede evidenciar la presencia del parásito (Agut y col., 2003).
- **Lesiones cutáneas:** afectan a más del 80% de los perros con leishmaniosis (Baneth y col., 2008). Las formas clínicas incluyen dermatitis localizadas producidas por el vector en el punto de inoculación en zonas del cuerpo desprovistas de pelo (lesión cutánea primaria o chancro de inoculación) o generalizadas, coincidiendo con la diseminación orgánica del parásito (dermatitis queratoseborreica, ulcerativa, nodular o pápulo-pustulosa) (Fondevila y col., 1997; Solano-Gallego y col., 2004; Ordeix y col., 2005; Giunchetti y col., 2006). Otras formas cutáneas son las hiperqueratosis nasales y/o plantares, depigmentación nasal, inflamación periungueal, onicogriposis (Font y col., 1996; Blavier y col., 2001) y eritema multiforme. También es posible encontrar piodermas bacterianos secundarios a algunas lesiones cutáneas. La forma cutánea más frecuente es la queratoseborreica (Figura I.13), seguida de la forma ulcerativa (Figura I.14). Con menor frecuencia se presentan la forma nodular y la pápulo-pustulosa (Ordeix y col., 2005).



Figura I.13. Leishmaniosis canina: forma queratoseborreica (G. Miró).



Figura I.14. Leishmaniosis canina: forma ulcerativa (G. Miró).

En conclusión y dada la enorme variabilidad de signos clínicos citados, se debe hacer hincapié en el hecho de que, en zonas endémicas, la aparición de uno sólo de los signos clínicos señalados debería ser motivo suficiente para incluir la leishmaniosis en el diagnóstico diferencial (Miró y Molina, 2006).

1.2.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la Lcan resulta problemático para los profesionales veterinarios, debido a la gran variedad de signos clínicos que presentan y a su analogía con los de otras infecciones (Ferrer, 1999), a la baja sensibilidad de detección del parásito por los métodos diagnósticos convencionales y a las diferentes respuestas inmunitarias que presentan los perros infectados por *L. infantum* (Mateo, 2007). El diagnóstico de la Lcan debe ser fiable, tanto en los pacientes enfermos como en aquellos infectados de forma subclínica (Miró y col., 2008).

1.2.4.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico

El cuadro clínico es válido para orientar el diagnóstico de la Lcan (ver apartado 1.2.3), siempre y cuando se apoye en una anamnesis exhaustiva que nos ofrezca datos epidemiológicos relevantes como el hábitat, el tipo de actividad que realizan o el tiempo de exposición al vector (Miró y Molina, 2006).

1.2.4.2. Diagnóstico laboratorial

1.2.4.2.1. Diagnóstico parasitológico

Es el método diagnóstico más fiable ya que consiste en evidenciar el parásito por visualización directa (observación microscópica de frotis, cultivo en medio específico, inoculación en animales de experimentación o xenodiagnóstico) o mediante técnicas de biología molecular como la PCR. Es un método que goza de una alta especificidad, en cambio la sensibilidad está condicionada por factores como el tipo de muestra biológica elegida o la fase en la que se presente la enfermedad, que va asociada a la carga parasitaria (Saridomichelakis y col., 2005; Mateo, 2007; Manna y col., 2009). La detección del parásito se realiza a partir de biopsias o aspirados de órganos hematopoyéticos (médula ósea, linfonodo, hígado y bazo), así como de piel y sangre (Alvar y col., 2004; Saridomichelakis y col., 2005).

La observación microscópica se basa en la visualización de amastigotes de *Leishmania* en el frotis del material aspirado, teñido mediante métodos metacromáticos convencionales (Giemsa, May-Grunwald, Diff-Quick) (Miró y Molina, 2006). La sensibilidad de la microscopía depende de la experiencia del observador, de la calidad del frotis, del número de campos visuales examinados y de la carga parasitaria. Aunque Alvar y col. (2004) destacan la baja sensibilidad de la microscopía en médula

ósea (60-75%) y en linfonodo (40-50%), Saridomichelakis y col. (2005) observan que la sensibilidad, tanto en médula ósea (92.6%) como en linfonodo (88.2%), es muy elevada en animales enfermos. La mayor desventaja de este método se debe a que la baja parasitemia presente en estos tejidos no permite aseverar que una punción negativa sea excluyente (Miró y Molina, 2006).

El cultivo de los aspirados en medio específico, siendo el más utilizado el NNN (Novy-Nicolle-McNeal), es ligeramente más sensible que la observación microscópica. Pero la tardanza en obtener un resultado positivo (en ocasiones puede superar las cuatro semanas) y la posibilidad de contaminaciones lo relegan a un segundo plano, utilizándose sobre todo en estudios epidemiológicos que requieren el aislamiento del parásito para su posterior tipificación (Alvar y col., 2004).

La inoculación de una muestra de tejido macerado procedente del animal sospechoso, en animales de experimentación, es de gran utilidad para obtener aislados de difícil crecimiento o recuperar inóculos contaminados.

El xenodiagnóstico es una técnica que consiste en exponer al perro sospechoso, previamente anestesiado, a las picaduras del vector, con el fin de demostrar la infección por *Leishmania* en el tubo digestivo de los flebotomos alimentados mediante la observación microscópica (Molina y col., 1994; Guarga y col., 2000a; Travi y col., 2001; Courtenay y col., 2002; da Costa-Val y col., 2007; Michalsky y col., 2007; Vercosa y col., 2008). El inconveniente de esta técnica es que es aplicable únicamente en laboratorios muy especializados que dispongan de un insectario con colonias de flebotomos (Molina, 1991). Por tanto, es una técnica utilizada con fines experimentales para evaluar la infectividad de aislados de *Leishmania* o la capacidad infectante de perros enfermos tratados con diferentes fármacos (Molina y col., 2000; Vergel y col., 2006; Ribeiro y col., 2008).

La técnica de PCR consiste en la amplificación de fracciones de ADN de *Leishmania* extraídas a partir de diferentes tipos de muestras biológicas. Se considera una técnica de elevada sensibilidad y especificidad puesto que es capaz de detectar el ADN equivalente a 0,001 parásitos (Cruz y col., 2002b). La sensibilidad y especificidad de la PCR es mayor en muestras de médula ósea, linfonodo, bazo o piel (Manna y col., 2004; Maia y col., 2009a; Reis y col., 2009). Algunos autores defienden métodos menos invasivos utilizando muestras de conjuntiva que han resultado ser muy sensibles y específicas para el diagnóstico de *L. infantum* (Strauss-Ayali y col., 2004; Ferreira Sde y col., 2008; Pilatti y col., 2009; Gramiccia y col., 2010; Leite y col., 2010).

En la actualidad se está empezando a aplicar la PCR cuantitativa en tiempo real (RTQ-PCR), que tiene la posibilidad de detectar cargas parasitarias más bajas que la PCR convencional (Francino y col., 2006). Además es capaz de determinar la carga parasitaria de la muestra estudiada (Pennisi y col., 2005; Manna y col., 2008; Quaresma y col., 2009). Hay muchos estudios que proponen la RTQ-PCR para monitorizar la eficacia del tratamiento de la leishmaniosis y predecir posibles recidivas durante el seguimiento (Francino y col., 2006; Mateo, 2007; Solano-Gallego y col., 2009).

Cabe destacar que la información aportada por la PCR debe ser evaluada conjuntamente con los datos serológicos y clínico-patológicos del animal. Por tanto, la decisión de tratar a un perro clínicamente sano contando únicamente con un diagnóstico de PCR de *Leishmania* positivo no es recomendable (Solano-Gallego y col., 2009).

1.2.4.2.2. Inmunodiagnóstico

Los métodos inmunológicos de diagnóstico permiten evaluar la respuesta inmunitaria celular y humoral.

En cuanto al estudio de la respuesta celular, la técnica utilizada es la prueba de hipersensibilidad retardada o Test de Montenegro (DTH). Esta técnica está basada en la inoculación intradérmica de una solución salina-fenolada de promastigotes denominada "leishmanina", valorándose a las 48-72 horas el diámetro de la induración. Los perros que presenten diámetros superiores a 5 mm se consideran "resistentes", ya que manifiestan una respuesta Th1 eficaz (Pinelli y col., 1994; Cardoso y col., 1998). Algunas razas autóctonas de regiones endémicas, como los Podencos Ibicencos, se consideran resistentes a la infección por *L. infantum*, ya que presentan un alto porcentaje de positivos a esta prueba (Solano-Gallego y col., 2000).

La evaluación de la respuesta humoral específica está ampliamente difundida en la Lcan. Las técnicas mayoritariamente utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), considerada el método serológico de referencia (Alvar y col., 2004; Miró y Molina, 2006), la técnica de enzoinmunoensayo (ELISA) y los test inmunocromatográficos o *dipsticks* (Solano-Gallego y col., 2009). Existe una correlación positiva clara entre la titulación de anticuerpos anti-*Leishmania* y la presencia de signos clínicos de la enfermedad (Solano-Gallego y col., 2001; Reis y col., 2006; Teixeira Neto y col., 2010). Un resultado claramente positivo por cualquiera de estas técnicas, junto a un cuadro clínico compatible, puede ser suficiente para establecer el diagnóstico definitivo, pero hay que ser cautos a la hora de interpretar un resultado dudoso, sobre todo en perros asintomáticos o que presenten cuadros clínicos atípicos (Miró y Molina,

2006). En los casos dudosos, la fiabilidad del resultado aumenta si se realizan varias determinaciones a intervalos de 30-60 días o si se realizan dos técnicas diferentes (Miró y Molina, 2006).

La técnica de IFI, que utiliza como fuente antigénica una suspensión de promastigotes completos de *Leishmania*, es altamente sensible y específica en la detección de casos clínicos, pero pierde sensibilidad en los casos subclínicos de la enfermedad (Mettler y col., 2005). El título de corte establecido oscila entre 1:40 y 1:160, y varía según el laboratorio (Solano-Gallego y col., 2009).

La sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA depende del antígeno de elección que puede ser desde proteínas somáticas escasamente purificadas, hasta componentes estructurales y proteínas de membrana (Porrozzi y col., 2007; Miró y col., 2008). Además se han desarrollado diferentes variantes del método clásico (ELISA competitivo, Dot-ELISA, FAST-ELISA) que son de gran utilidad en los estudios de campo por su simplicidad, rapidez de ejecución y sensibilidad; y muy útiles para estudios epidemiológicos en áreas endémicas de la Lcan (Dietze y col., 1995; Cardoso y col., 2004; Mateo, 2007).

Los test inmunocromatográficos o *dipsticks* se han desarrollado fundamentalmente utilizando el antígeno rK39 y muestran buena especificidad, pero su sensibilidad es variable, por lo que su rendimiento no se considera óptimo actualmente (Mettler y col., 2005; Lemos y col., 2008; Solano-Gallego y col., 2009).

1.2.4.2.3. Alteraciones clínico-patológicas

Los resultados de la analítica pueden orientar el diagnóstico, sobre todo en los casos dudosos, y para conocer el estado general del animal sospechoso. Además supone un apoyo importante en el seguimiento de los perros tratados. El hemograma suele caracterizarse por la presencia de anemia, leucopenia en las formas graves y trombocitopenia por afección del sistema hematopoyético. En el perfil bioquímico hepato-renal, observamos en algunos casos valores elevados de enzimas hepáticas y, en animales con lesiones renales, una elevación de la creatinina y urea por la deposición de inmunocomplejos a nivel del glomérulo renal (Rallis y col., 2005). En el proteinograma destaca la hipergammaglobulinemia y la inversión del cociente albúmina/globulinas, estando la hipoalbuminemia asociada a un incremento de las globulinas (Miró y Molina, 2006). En el urianálisis es frecuente la aparición de proteinuria, signo evidente de enfermedad renal. Puede observarse un incremento del cociente proteínas/creatinina en orina (Palacio y col., 1995), la presencia de ciertas enzimas hepáticas en la orina (Palacio y col., 1997), o hematuria.

1.2.4.3. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial deberá establecerse siempre que los animales enfermos presenten signos clínicos compatibles con la Lcan pero en los que el diagnóstico resulte negativo o dudoso. Resulta necesario establecer el diagnóstico diferencial con otras patologías, principalmente con todas aquellas enfermedades que cursen con lesiones cutáneas (enfermedades autoinmunes, endocrinopatías, otras dermatosis parasitarias...) y con algunas otras enfermedades vectoriales como ehrliquiosis, enfermedad de Lyme, babesiosis, hepatozoonosis... Además, hay que tener presente que, en un elevado porcentaje de los casos, los perros con Lcan pueden padecer otros procesos concomitantes, asociados a la transmisión vectorial o debido a la inmunosupresión que padecen (Miró y Molina, 2006).

1.2.5. CONTROL

Las estrategias propuestas para el control de esta enfermedad se centran en un diagnóstico precoz, el tratamiento de los perros infectados, el desarrollo de nuevas moléculas candidatas para el tratamiento, el ensayo de nuevas vacunas y la lucha antivectorial.

Las medidas de control planificadas frente al reservorio son muy importantes ya que evitan el avance de la transmisión hacia los flebotomos. En zonas endémicas, es aconsejable realizar un diagnóstico serológico en otoño que nos garantice que los animales no se han infectado en la época de actividad del vector (de mayo a octubre en climas templados), y hacer una valoración clínica exhaustiva de los casos seropositivos (Miró y Molina, 2006). El problema que tienen estas campañas de control de la Lcan es que, al basar el diagnóstico exclusivamente en la serología y en los signos clínicos de los animales, no se detectan los perros seronegativos con infección subclínica (Mateo, 2007). El debate suscitado ante la presencia de un perro enfermo siempre ha girado en torno a la disyuntiva de la eutanasia o el tratamiento. El tratamiento de los perros enfermos suele implicar una curación clínica de la enfermedad. Adicionalmente, se ha documentado mediante xenodiagnóstico que la infectividad de los flebotomos alimentados en perros tratados es prácticamente nula al menos varios meses postratamiento (Gradoni y col., 1987; Alvar y col., 1994; Molina y col., 2000; Ribeiro y col., 2008). La OMS, que sigue recomendando la eutanasia de los perros infectados por *L. infantum*, reconoce que esta medida es de difícil implantación tanto por razones éticas como sociales (Desjeux, 1996; TDR, 2002). Sin embargo, en un estudio reciente realizado en São Paulo, Brasil, Nunes y col. (2010) han observado una reducción significativa de la LVH durante los 10 años en los que se ha aplicado la eutanasia activa en perros infectados. Exceptuando la región occidental de China donde parece haberse erradicado la leishmaniosis combinando el rociamiento intradomiciliario de insecticidas

y la eutanasia de los perros seropositivos (Zhi-Biao, 1989), los restantes programas de control a gran escala basados en la eliminación sistemática de perros infectados han logrado unos resultados bastante pobres. Tanto en Bahía (Brasil) como en Creta se ha observado que la eliminación de los perros seropositivos no reduce la incidencia de la leishmaniosis, que actualmente sigue sufriendo un incremento constante (Moreira y col., 2004; Antoniou y col., 2009). La baja eficacia de esta medida profiláctica se puede deber a que los métodos serológicos en los que se basa el diagnóstico no poseen suficiente especificidad y/o sensibilidad para identificar a los perros realmente infectados, o a que los perros eliminados son rápidamente reemplazados por nuevos cachorros susceptibles a la infección. También puede deberse a la implicación de otros reservorios, aparte del perro, en el mantenimiento de la enfermedad, al tiempo que lleve infectado un animal cuando se decide eliminarlo o a la oposición del propietario sobre todo en perros con infección subclínica (Courtenay y col., 2002; Moreira y col., 2004; Dantas-Torres y Brandao-Filho, 2006; Nunes y col., 2008).

La utilización de vacunas frente a la Lcan representaría, sin duda alguna, la estrategia idónea para el control de la enfermedad (Davies y col., 2003). La utilización de una vacuna eficaz favorecería la reducción drástica tanto de la Lcan como de la leishmaniosis humana (Miró y Molina, 2006).

Las medidas de control planificadas frente al vector son cruciales ya que, además de impedir el contacto con el animal, reducen notablemente su número y en consecuencia la transmisión de la enfermedad.

1.2.5.1. Terapéutica

En lo que respecta a la quimioterapia de la Lcan, en estos últimos años ha habido pocos avances destacables. Los protocolos de tratamiento y el seguimiento clínico han evolucionado notablemente, pero los fármacos utilizados son básicamente los mismos desde hace años. De todos modos, gracias a la mejora de la asistencia veterinaria, las expectativas de curación clínica - no parasitológica - son mucho mayores que antes, aunque en ocasiones no sea posible impedir la recidiva originada en situaciones de inmunosupresión (estrés, enfermedades debilitantes...) (Baneth y Shaw, 2002). De entre todos los fármacos disponibles, los leishmanicidas más utilizados son los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®), seguidos de la miltefosina (Milteforán®). La Anfotericina B en su estado natural o en su forma lipídica (Fungizona® y AmBisome®, respectivamente), son muy poco utilizados en medicina veterinaria tanto por su elevado precio como por su modo de aplicación (vía endovenosa). El leishmanioestático por excelencia es, por su inocuidad y eficacia, el alopurinol (Zyloric®) (Miró y Molina, 2006).

Los protocolos de administración de **los antimoniales** varían considerablemente, no existiendo un consenso general sobre las dosis adecuadas, aunque la mayoría de los autores recomiendan una dosis de 75-100 mg/kg/día durante 4-8 semanas (Solano-Gallego y col., 2009). Estudios farmacocinéticos han demostrado que la administración de los antimoniales pentavalentes por vía subcutánea es la más adecuada (Valladares y col., 1996). La toxicidad de los antimoniales puede dar lugar a estibointolerancia, que se manifiesta tras las primeras administraciones, o a estibotoxicidad, que aparece al final del tratamiento por efecto acumulativo. Aunque a veces es difícil determinar si las alteraciones que se producen en el enfermo tratado son efectos secundarios de la quimioterapia o consecuencia de la propia enfermedad, la toxicidad que se presenta en pacientes con alteraciones renales es mayor tanto en el perro (Zaghloul y Al-Jasser, 2004) como en el humano (Oliveira y col., 2009a). **La combinación de antimoniales pentavalentes y alopurinol** es la terapia de primera elección y la más eficaz (Solano-Gallego y col., 2009), ya que ambos fármacos tienen un efecto sinérgico que potencia la eficacia, prolonga los periodos de remisión clínica y retrasa la aparición de recidivas (Ginel y col., 1998; Denerolle y Bourdoiseau, 1999; Baneth y Shaw, 2002; Mateo y col., 2009).

Actualmente se considera el uso de **la miltefosina** (Milteforan®), a una dosis de 2 mg/kg/día durante 4 semanas, en combinación con alopurinol como segunda elección en el tratamiento de la Lcan. Esta alternativa a la combinación de antimoniales pentavalentes y alopurinol tiene la ventaja de que, tanto la miltefosina como el alopurinol, se administran por vía oral y no producen toxicidad a nivel hepato-renal (Mateo y col., 2009; Miró y col., 2009; Solano-Gallego y col., 2009; Woerly y col., 2009). Los efectos secundarios de la miltefosina incluyen trastornos digestivos de distinta consideración que se reducen casi en su totalidad cuando se administra junto con el alimento (Woerly y col., 2009).

Se ha documentado la pobre eficacia que tiene **el alopurinol** cuando se administra como único tratamiento (Koutinas y col., 2001), aunque ha sido aconsejado en casos de proteinuria o insuficiencia renal crónica (Plevraki y col., 2006). La dosis habitual utilizada de alopurinol, que es poco tóxico y bien tolerado, es de 10 mg/kg/día durante 6-12 meses por vía oral (Mateo, 2007; Solano-Gallego y col., 2009). El tratamiento prolongado con alopurinol es efectivo para evitar la remisión del cuadro clínico (Ginel y col., 1998) pero, dependiendo de la capacidad del animal para controlar la enfermedad, éste tendrá una duración variable en el tiempo (Solano-Gallego y col., 2009).

La anfotericina B sería uno de los fármacos de tercera elección y su uso en perros sería limitado ya que, aunque la eficacia inicial es buena y se consiguen mejorías clínicas e incluso remisión de signos clínicos, no evita las recaídas (Oliva y col., 1995). Además tiene las desventajas de ser nefrotóxico y de administración intravenosa (Solano-Gallego y col., 2009). La dosis recomendada es de 0,5-0,8 mg/kg/día en perfusión endovenosa lenta en días alternos durante dos meses. Actualmente se están utilizando formas liposomadas de anfotericina B con buenos resultados (Lamothe, 2001). La anfotericina B puede dar lugar a diversas reacciones adversas: insuficiencia renal, flebitis localizada, anorexia, vómitos, alteraciones de los niveles Na/K y necrosis tisular por extravasación del fármaco (Miró y Molina, 2006).

Se han descrito resistencias al tratamiento para algunos de estos compuestos, concretamente a los antimoniales pentavalentes (Baneth y Shaw, 2002).

Una vez escogido el tratamiento, es necesario valorar la respuesta al mismo mediante la evolución clínica y los resultados de las analíticas, un mes después de iniciar el primer ciclo leishmanicida y, posteriormente, cada 3-4 meses. Hay que tener en cuenta que la eficacia del tratamiento depende en gran medida de la gravedad de los signos que presente el animal, presentando aquellos perros con insuficiencia renal un peor pronóstico (Solano-Gallego y col., 2009). La evolución desfavorable después de un ciclo terapéutico exige el replanteamiento del tratamiento e incluso del diagnóstico, valorando la presencia de enfermedades concomitantes. La clave del éxito terapéutico es el control de la aparición de recaídas, ya sea por reinfección o por recidiva, mediante controles anuales o bianuales del nivel de anticuerpos y del estado clínico, incluyendo las posibles alteraciones clínico-patológicas que se presenten (Miró y Molina, 2006).

1.2.5.2. Inmunoprofilaxis

En la actualidad son muchos los grupos de investigación involucrados en el desarrollo de una vacuna frente a la infección por *Leishmania* (Miró y col., 2008; Palatnik-de-Sousa, 2008) capaz de inducir una inmunidad celular eficaz. En perros se han evaluado cuatro tipos de vacunas a base de: parásitos muertos (Mayrink y col., 1996; Lasri y col., 1999; Mohebbali y col., 2004; Giunchetti y col., 2008b), antígenos purificados (da Silva y col., 2000; Borja-Cabrera y col., 2002; Lemesre y col., 2005; Lemesre y col., 2007), antígenos recombinantes (Gradoni y col., 2005) y ADN (Ramiro y col., 2003; Rafati y col., 2005; Rodríguez-Cortés y col., 2007).

En la denominada primera generación de vacunas, Convit y col. (1987) fueron los pioneros en el uso de parásitos muertos junto con *Bacillus* de Calmette y Guérinas

(BCG) como adyuvante para la inmunoterapia de la LCH. Mohebalí y col. (2004) hicieron un seguimiento de perros durante 16 meses con una vacuna basada en parásitos de *L. major* autoclavados y BCG, y observaron un 69% de eficacia. Mayrink y col. (1996) utilizaron promastigotes de *L. braziliensis* lisados por sonicación junto con BCG, obteniendo una protección del 76% en los animales vacunados. En la aplicación de estas vacunas se ensaya la combinación de la inmunoterapia con la quimioterapia con el fin de reducir los efectos adversos producidos por esta última (Mayrink y col., 2006). En Brasil, ha sido autorizada para su uso la vacuna de primera generación ideada por el grupo de Mayrink y col. (1996) como complemento al uso de antimoniales durante el tratamiento.

Las vacunas a partir de antígenos purificados han resultado ser las que han dado mejores resultados (Solano-Gallego y col., 2009). El más representativo de estos antígenos es una fracción enriquecida de la glicoproteína GP63 de *L. donovani*, también conocida con el nombre de FML (ligando fructosa-manosa). Esta vacuna, basada en la inmunización mediante este antígeno recombinante, se ha probado en perros expuestos a la infección natural en ensayos de campo de 11, 24, y 48 meses de duración respectivamente (Nogueira y col., 2005; da Silva y col., 2000; Borja-Cabrera y col., 2002;). La vacuna registrada, cuyo nombre comercial es Leishmune[®], mostró una eficacia del 92-95% en perros (da Silva y col., 2000; Borja-Cabrera y col., 2002), y aseguró además la ausencia del parásito y de los signos clínicos de la enfermedad en estos animales (Nogueira y col., 2005). Pero la eficacia global obtenida con esta vacuna ensayada en el campo fue de un 76-80% (Borja-Cabrera y col., 2002; Borja-Cabrera y col., 2008). El adyuvante de esta vacuna, la saponina, potencia su eficacia, pero tiene el inconveniente de causar efectos secundarios como astenia, fiebre o reacciones cutáneas adversas en el punto de inoculación en más del 37% de los animales vacunados, lo que representa un gran obstáculo en el terreno práctico. En perros enfermos se ha observado que la vacuna es capaz de bloquear la transmisión de la infección (Saraiva y col., 2006), además de tener propiedades inmunoterapéuticas (Borja-Cabrera y col., 2004; Santos y col., 2007; de Lima y col., 2010) incluso mejores cuando se combinan con quimioterapia (Borja-Cabrera y col., 2010). En Brasil, primer país donde se comercializó Leishmune[®], los profesionales veterinarios se muestran reticentes a su uso masivo en la población canina, ya que en un país donde la eutanasia de los perros seropositivos es obligatoria, hoy en día es casi imposible diferenciar si los perros que presentan anticuerpos anti-*Leishmania*, han sido generados debido a una infección natural o a la propia vacuna (de Oliveira Mendes y col., 2003; Dantas-Torres y Brandao-Filho, 2006). En Francia se ha generado una segunda vacuna a partir del antígeno purificado LiESAp, excretado por promastigotes de *L. infantum*

en cultivo, con MDP (muramil dipéptido) como adyuvante (Lemesre y col., 2005). Esta vacuna, basada en la inducción de una respuesta tipo Th1, se ha probado en un ensayo con doble-ciego en perros expuestos naturalmente a la infección, en ensayos de campo de 24 meses de duración, obteniéndose una eficacia del 92% (Lemesre y col., 2007).

Por otra parte, en el modelo experimental canino se han desarrollado otros candidatos vacunales basados en los siguientes antígenos recombinantes: TSA, Leif y LmSTI1 (Fujiwara y col., 2005), H1, HASPB1, MML (Moreno y col., 2007), CPS, CPB (Poot y col., 2006), BCG (Molano y col., 2003) y MML (Gradoni y col., 2005), demostrando cada uno de ellos diferentes grados de protección excepto éste último que no protege a los perros frente a la infección, ni siquiera de manera parcial. En cambio, en Brasil se ha demostrado la eficacia de la proteína recombinante MML en el tratamiento de la Lcan (Trigo y col., 2010).

Comparando con las vacunas basadas en antígenos recombinantes, las vacunas de ADN son mucho más estables, tienen menor coste y la posibilidad de combinar varios genes en un solo candidato vacunal es muy prometedora (Palatnik-de-Sousa, 2008). Un ensayo llevado a cabo en perros vacunados con el antígeno LACK vehiculizado en plásmidos, seguido de una dosis recordatoria vehiculizada en el virus Vaccinia, consiguió una protección del 60% de eficacia tras 17 meses de seguimiento (Ramiro y col., 2003). Otro estudio donde se combinó el uso de ADN y proteínas antigénicas (CPA y CPB), mostró la ausencia del parásito en médula ósea en los diez perros vacunados (Rafati y col., 2005). En cambio, un ensayo realizado con un plásmido multiantigénico que codificaba 4 proteínas no mostró protección frente a la infección por *L. infantum* (Rodríguez-Cortés y col., 2007).

En la actualidad cabe destacar lo novedoso que resulta el diseño de otro tipo de vacunas que actúan sobre algunos componentes de la saliva de los flebotomos o del tubo digestivo del insecto (Palatnik-de-Sousa, 2008), como es el caso de la proteína denominada maxadilano (Brodie y col., 2007) o el antígeno SP15 (Valenzuela y col., 2001).

Pero a pesar de todos los esfuerzos y progresos realizados en esta última década por numerosos grupos de investigación en la búsqueda de candidatos vacunales frente a la Lcan, el objetivo final de obtener una vacuna completamente eficaz que funcione a gran escala en el campo, no se ha alcanzado todavía. Queda aún camino por recorrer, que vendrá acompañado del diseño de nuevos candidatos vacunales y de adyuvantes más seguros (Miró y col., 2008).

1.2.5.3. Lucha antivectorial

Para evitar la progresión de la transmisión de la Lcan hacia los flebotomos se deben adoptar estrategias que impidan la picadura del vector e incluso que reduzcan sus poblaciones (Solano-Gallego y col., 2009). Cabe destacar las siguientes acciones:

- Mantener al perro en el interior de la vivienda, fundamentalmente desde el atardecer hasta el amanecer durante la época de actividad del flebotomo, que es cuando éstos abandonan los lugares de reposo para alimentarse (Zaffaroni y col., 1999; Martín-Sánchez y col., 2009; Gálvez y col., 2010a).
- Protección de las viviendas y de las casetas de los perros con telas mosquiteras apropiadas (Miró y Molina, 2006).
- Evitar la presencia de hábitat favorables para los flebotomos en las proximidades de las viviendas (Killick-Kendrick, 1999; Kishore y col., 2006; Sharma y Singh, 2008).
- Rociamiento de viviendas con insecticidas residuales (Alexander y Maroli, 2003; Sharma y Singh, 2008; Quinnell y Courtenay, 2009).
- Aplicación sobre el perro de insecticidas tópicos de probada eficacia (Alexander y Maroli, 2003; Miró y col., 2008; Quinnell y Courtenay, 2009).

La lucha antivectorial frente a los flebotomos mediante el uso de insecticidas sólo se puede emplear con los individuos adultos, debido al desconocimiento que se tiene de los lugares precisos donde se desarrollan las fases larvarias (Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008). Además, cuando se sospecha de lugares donde se pueden encontrar estas fases inmaduras del vector (mechinales, madrigueras, oquedades del terreno, alcantarillado...), el acceso a los mismos mediante insecticidas entraña grandes dificultades (Miró y Molina, 2006). Aunque los flebotomos son en general bastante sensibles a los insecticidas comúnmente utilizados en la lucha antivectorial, se han descrito resistencias sobre todo cuando se han usado a gran escala (Alexander y col., 2009). En ensayos de laboratorio se han detectado resistencias sobre todo al DDT (Singh y col., 2001), aunque también se han detectado al deltametrín y al permetrín (Amalraj y col., 1999).

Los hábitat domésticos y peridomésticos son los más apropiados para el rociamiento domiciliario con insecticidas. Se deben tratar las paredes interiores de las viviendas, los quicios y jambas de puertas y ventanas, y cualquier hábitat favorable para los flebotomos como son perreras, leñeras, gallineros, establos, orificios, mechinales, grietas de muros... (Alexander y Maroli, 2003; Sharma y Singh, 2008). El control intradomiciliario de los flebotomos debe ser completado con la colocación de mallas protectoras, con una luz no superior a 0,3-0,4 mm², en ventanas, puertas y perreras

(Miró y Molina, 2006). También es muy aconsejable el uso de cortinas y mosquiteras tratadas con piretroides (Alexander y Maroli, 2003; Sharma y Singh, 2008; Quinnell y Courtenay, 2009).

La aplicación tópica de insecticidas en el perro, siguiendo correctamente las pautas de aplicación del fabricante, es hoy en día la mejor herramienta profiláctica que existe para evitar la transmisión de la Lcan. El uso de estas formulaciones proporciona un doble efecto, repelente y/o insecticida que es capaz de ahuyentar o matar a los flebotomos que entran en contacto con un perro tratado. Se han ensayado diferentes formulaciones en collares de plástico, pipetas o pulverizadores, basadas fundamentalmente en la aplicación de piretroides sintéticos.

El principio activo de los collares, el deltametrin, se libera de forma progresiva por el tejido adiposo subcutáneo del perro, alcanzando su máxima eficacia a las 2 semanas de su colocación (Killick-Kendrick y col., 1997; Halbig y col., 2000; Solano-Gallego y col., 2009). El efecto repelente del collar puede persistir de manera óptima durante ocho meses (Killick-Kendrick y col., 1997; Lucientes, 1999; David y col., 2001). Se ha demostrado la eficacia de estos collares frente a diferentes especies de flebotomos de Europa, Asia y Sudamérica. Además el uso masivo de collares en el perro como medida de control, disminuye significativamente la seroprevalencia de la enfermedad en zonas endémicas, tanto en perros como en niños (Maroli y col., 2001; Gavgani y col., 2002; Reithinger y col., 2004; Foglia Manzillo y col., 2006).

Las formulaciones tópicas aplicadas mediante pipetas proporcionan altos niveles de repelencia, aunque de menor duración si se comparan con los collares (Reithinger y col., 2001). En cambio, estas formulaciones requieren sólo unas 24 horas para que el insecticida se distribuya homogéneamente por el estrato córneo del perro (Miró y col., 2007a; Miró y col., 2008). La aplicación de permetrín al 65% proporciona unos buenos efectos repelente e insecticida que se prolongan hasta 7 semanas, aunque los valores óptimos se alcanzan durante las primeras 4 semanas, recomendándose en consecuencia la aplicación mensual de esta presentación (Molina y col., 2001; Reithinger y col., 2001). La combinación de permetrín al 50%, con imidacloprid al 10%, potencia las propiedades del piretroide mediante la acción sinergizante del insecticida nicotinoide, prolongándose su efecto durante 3-4 semanas (Maazoun y col., 1981; Mencke y col., 2003; Mencke y col., 2005; Miró y col., 2007a; Otranto y col., 2007). También se ha demostrado que la aplicación masiva de estos productos entre la población canina disminuye la incidencia de la Lcan durante dos (Otranto y col., 2007) y cuatro años (Podaliri Vulpiani y col., 2009), respectivamente.

En cuanto a las formulaciones pulverizables tienen la ventaja de que consiguen un efecto inmediato desde el momento inicial de su aplicación, pero su persistencia es menor (Miró y Molina, 2006). La combinación de permetrín con piriproxifeno, un inhibidor del crecimiento de los insectos, posee un aceptable efecto repelente frente a *P. perniciosus* que perdura unas 3 semanas (Gálvez, 2001; Molina y col., 2006).

Por tanto, la interrupción de la transmisión de la Lcan mediante la aplicación tópica de insecticidas en cualquiera de sus formulaciones sobre el perro es una estrategia clave a tener en consideración en futuros programas de control de la Lcan (Ferroglío y col., 2008).

I.3. ANÁLISIS ESPACIAL DE ENFERMEDADES

El primer estudio de la distribución espacial de enfermedades se remonta al año 500 aC, cuando Hipócrates resaltó la importancia del ambiente como causa de enfermedad en el tratado "Sobre los aires, aguas y lugares". Es en 1854 cuando John Snow relaciona las localizaciones geográficas de casos de cólera en Londres con un surtidor de agua que se comportó como fuente de la infección (Figura I.15). Pero no ha sido hasta más de 150 años después del trabajo de John Snow cuando los profesionales de las ciencias de la salud están redescubriendo la importancia que representa el análisis espacial de las enfermedades. Este análisis se muestra en la actualidad como una potente herramienta en la identificación de las áreas de riesgo, permitiendo determinar con gran precisión los lugares donde implementar las medidas de control oportunas (Pfeiffer y col., 2008).



Figura I.15. Mapa del brote de cólera acaecido en Londres, descrito por John Snow (1854). Las defunciones se representan mediante puntos y los surtidores de agua con cruces.

La transmisión de enfermedades infecciosas se ve incrementada por la presencia de factores de riesgo próximos y coetáneos al individuo susceptible. El análisis espacial de enfermedades describe la variación que existe en el espacio y en el tiempo en la ocurrencia de las mismas (Rinaldi y col., 2006a).

Mediante el análisis espacial de enfermedades se pueden alcanzar los siguientes objetivos generales (Figura I.16): descripción de un modelo espacial, identificación de los *cluster* o agrupación de casos de enfermedad y creación de mapas de riesgo (Pfeiffer y col., 2008). Los datos que se analizan para alcanzar los objetivos descritos anteriormente se encuentran en bases de datos asociadas a entidades geográficas referenciadas mediante sistemas globales de posicionamiento (GPS) (Reisen, 2010).

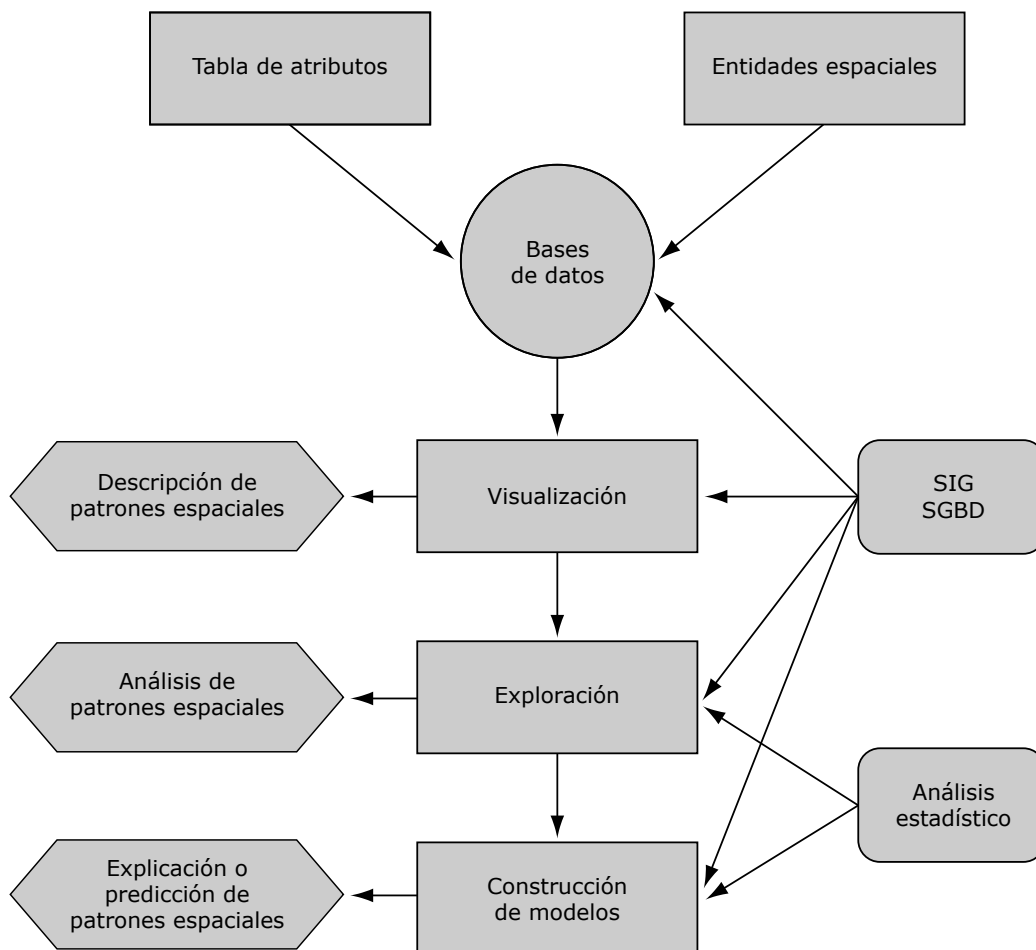


Figura I.16. Diagrama conceptual del análisis espacial de enfermedades. Tomado de Pfeiffer y col. (2008).

El manejo de los datos se realiza mediante el uso de los sistemas de información geográfica (SIG) y los sistemas de gestión de las bases de datos (SGBD). Los métodos analíticos que se utilizan para alcanzar los objetivos propuestos son: la visualización y exploración de los datos espaciales y la construcción de modelos ("modelling"). La visualización es el método analítico más utilizado y culmina con la producción de

mapas que describen los patrones espaciales, e incluso identifica aquellos factores que podrían estar implicados en la distribución de la enfermedad. La exploración conlleva el uso de análisis estadísticos e identifica los patrones de distribución de la enfermedad. Finalmente, los modelos se construyen a partir de aquellos factores que explican o predicen la distribución espacial de la enfermedad.

I.3.1. Aplicación de los SIG a las enfermedades transmitidas por vectores

Hoy en día, la mejora de los sistemas informáticos junto con la aparición de nuevas tecnologías, han enriquecido a la cartografía, que ha pasado de ser una mera disciplina donde se realizaba únicamente la representación de un territorio, a ser un elemento fundamental en la resolución de problemas, planificación, gestión y modelización de determinados fenómenos referenciados en una región determinada. Los SIG se definen como un conjunto organizado de tecnología informática (equipo computacional, paquetes de programas, datos geográficos y no geográficos en formato digital), métodos, procedimientos y personal, diseñado para la captura, almacenamiento, recuperación, manipulación, análisis, modelización y presentación de datos geográficamente referenciados. Su propósito es apoyar la toma de decisiones en la solución de problemas que ocurren en un espacio geográfico determinado (Rinaldi y col., 2006b). Los SIG almacenan de forma independiente diferentes capas temáticas superpuestas y permiten relacionar la información entre ellas (Figura I.17).

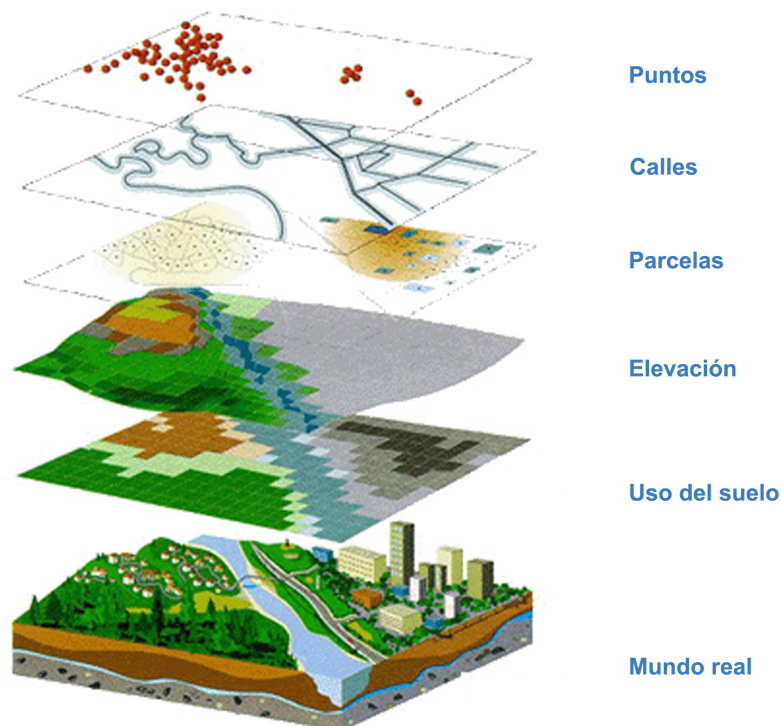


Figura I.17. Los SIG son capaces de gestionar las variables de interés en forma de cartografía temática (capas superpuestas), con el fin de analizar las relaciones existentes entre capas, celda a celda.

Los satélites, gracias a los sensores multiespectrales que transportan a bordo, proporcionan multitud de información sobre determinados factores en una región determinada, como pueden ser la topografía, la climatología (precipitaciones, temperatura, humedad), los usos del suelo o los índices de vegetación (el índice NDVI - *Normalized Difference Vegetation Index*- es el más utilizado). Conociendo estos factores que afectan a la dinámica de la población de vectores, se podrán estimar las probabilidades de transmisión del agente patógeno (Hugh-Jones, 1989; Hay y col., 1996; Beck y col., 2000; Green y Hay, 2002; Kalluri y col., 2007). Esta información obtenida por los satélites y almacenada año tras año, podrá ser utilizada para predecir las variaciones de la densidad del vector, así como para conocer las tasas de infección en un lugar concreto (Hugh-Jones, 1989; Hay y col., 2006).

Los SIG, en combinación con la información proporcionada por los sensores remotos (teledetección), han enriquecido la información disponible sobre la ecología de los vectores, lo que permitirá controlar con más eficacia las enfermedades transmitidas por ellos (Rinaldi y col., 2006b; Kalluri y col., 2007). Esto ha hecho posible el desarrollo, en el espacio y en el tiempo, de mapas de riesgo y modelos de predicción de un vector determinado (Kitron, 2000; Cringoli y col., 2005), mediante su correlación con variables medioambientales y meteorológicas (Freier y FitzMaurice, 1998; Thomson y Connor, 2000).

La integración de las variables espaciales y temporales proporcionará un eficaz sistema informativo sobre la dinámica de un vector, en relación a la distribución de la enfermedad, y en consecuencia de las medidas de control a adoptar (Washino y Wood, 1994).

Coincidiendo con el desarrollo de nuevos y más potentes sensores remotos y con una mayor accesibilidad al software destinado al procesamiento de imágenes y a los SIG, en la actualidad se multiplican los estudios de fenómenos espaciales aplicados a la epidemiología de las enfermedades transmitidas por vectores, y en particular a la leishmaniosis (Ready, 2008, 2010).

Es a finales de los años 90 del siglo XX cuando surgen los primeros estudios que identifican la asociación entre los factores ambientales y climatológicos y la presencia del flebotomo. Mediante el uso de imágenes de satélite y el trabajo de campo, se han identificado en Sudán las variables asociadas a la distribución de *Phlebotomus orientalis* (Elnaiem y col., 1998). Se han utilizado los datos de las estaciones meteorológicas junto con las imágenes de satélite para construir los primeros mapas de riesgo que predicen la presencia de *Phlebotomus papatasi* a

lo largo del año en el sudoeste asiático, basándose en 136 artículos científicos (Cross y col., 1996). La construcción de un modelo de regresión múltiple, basado en el trabajo de campo y en las imágenes de satélite, ha permitido elaborar un mapa de riesgo sobre la presencia de *P. orientalis* en Sudán (Thomson y col., 1999). En un estudio llevado a cabo en Brasil, empleando imágenes TM-LANDSAT, se ha podido determinar que la proximidad a los cursos de agua y a las áreas forestales son factores asociados a la presencia de LCH (Miranda y col., 1996; Miranda y col., 1998).

Desde comienzos del siglo XXI se han llevado a cabo infinidad de trabajos, cada vez más elaborados, relacionados con el uso de técnicas de geoprosesamiento. El uso de modelos de regresión múltiple basados en la recopilación de trabajos históricos e imágenes de satélite, permiten predecir la distribución espacial de *P. orientalis* en el este de Sudán (Elnaiem y col., 2003) y de *Phlebotomus martini* y *P. orientalis* en la región oriental de África (Gebre-Michael y col., 2004). King y col. (2004) han construido un mapa de riesgo de la incidencia a nivel municipal de la LCH en Colombia en 1994, apoyándose en datos del Ministerio de Salud Colombiano, siendo las variables explicativas del modelo la altitud y los usos del suelo. En Brasil, se han usado imágenes de satélite y bases de datos del periodo 1990-1998, tanto de la incidencia de la leishmaniosis como de la presencia del vector, obteniéndose áreas de riesgo de la transmisión de la enfermedad asociadas a bajos valores del índice de vegetación NDVI (Bavia y col., 2005). Otros estudios correlacionan de forma negativa la altitud con la transmisión de la leishmaniosis (Margonari y col., 2006) y el tipo de vegetación con la presencia del vector (Claborn y col., 2008). La construcción de grandes infraestructuras, que ocasiona el desplazamiento de un gran número de personas, explica la expansión de la LV de oeste a este en la región del Mato Grosso do Sul en Brasil (Correa Antonialli y col., 2007). En la zona del monte Vesubio, al sur de Italia, se ha establecido una relación entre la zona donde se detectó la presencia de *P. perniciosus* - costa o montaña - y otras variables como la orientación o el uso del suelo (Rossi y col., 2007).

El avance en el análisis espacial de los datos puntuales, potenciado por el desarrollo de modelos geoestadísticos, ha permitido cuantificar y modelar patrones espaciales en la transmisión de la leishmaniosis en Teresina, Brasil (Werneck y col., 2002; Werneck y Maguire, 2002; Werneck y col., 2007; Cerbino Neto y col., 2009).

Existen numerosos estudios que detectan y analizan la presencia de agrupaciones - *clusters* - de casos de leishmaniosis, en el espacio y/o en el tiempo, en cantidades superiores a lo que cabría esperar por el azar. Para la detección de los *clusters*

de leishmaniosis se utiliza una gran variedad de métodos estadísticos como los que a continuación se mencionan: el test de Knox (Machado-Coelho y col., 1999; Oliveira y col., 2001), el método de exploración de Kulldorf (Ryan y col., 2006; Carneiro y col., 2007; Salah y col., 2007; Oliveira y col., 2009b; Khanal y col., 2010), el test de Moran (Ben-Ahmed y col., 2009) y el test de Cuzick y Edwards (Schriefer y col., 2009).

A partir del “modelo del nicho ecológico” (ENM- *Ecological Niche Modelling*), basado en el algoritmo genético de cómputo GARP (*Genetic Algorithm for Rule-Set Prediction*) y en variables climáticas y topográficas, se han realizado proyecciones de mapas que estiman las distribuciones potenciales de los flebotomos (Peterson y Shaw, 2003; Colacicco-Mayhugh y col., 2010; González y col., 2010) y de la leishmaniosis (Nieto y col., 2006; Chamaille y col., 2010); en Brasil, Oriente Medio, Francia y sur de Estados Unidos.

El cambio global, que incluye el efecto combinado de cambios tanto climáticos como medioambientales, fruto del impacto del ser humano sobre su entorno, puede incrementar el riesgo de transmisión de las enfermedades transmitidas por vectores (Patz y col., 2000; Sutherst, 2004; Jacob, 2008; Slenning, 2010). El fenómeno de El Niño/oscilación austral (ENOA) conlleva una variabilidad climática natural que abarca cambios en las temperaturas y en los regímenes de lluvias, y se ha asociado con un aumento del riesgo epidemiológico de la leishmaniosis. Se sugiere que las predicciones de los cambios futuros del clima serían análogos a los patrones espaciales de ENOA, por lo que su estudio exhaustivo podría servir para orientarnos sobre cual va a ser el impacto del cambio climático en el futuro (Sutherst, 2004). La incidencia de la LVH aumentó un 39% y un 33% en 1989 y 1995, respectivamente, tras las oscilaciones climáticas del ENOA en el estado de Bahia, Brasil (Franke y col., 2002). El impacto del ENOA durante el periodo comprendido entre 1985-2002 sobre la leishmaniosis en el noreste y sur de Colombia tuvo como consecuencia un aumento en el número de casos de la enfermedad (Cárdenas y col., 2006; Cárdenas y col., 2008). Existen algunas predicciones sobre la distribución geográfica de los flebotomos bajo la premisa del cambio climático. Los primeros mapas construidos para predecir la presencia de *P. papatasi* en el suroeste asiático, mediante simulaciones que estiman un aumento de la temperatura de 1 a 5°C, han demostrado la expansión del área geográfica del vector a medida que aumentan las temperaturas (Cross y Hyams, 1996). Estudios realizados en Italia, predicen un incremento de la Lcan y la expansión del área de distribución de *P. perniciosus* hasta Suiza, tras la interpretación de un modelo de análisis multivariante basado en una simulación en la que se tiene en cuenta un incremento de la temperatura debido al efecto del cambio climático (Kuhn, 1999).

La aplicación del modelo de nicho ecológico ha conseguido cartografiar la expansión de tres especies de *Lutzomyia* en el sur de Brasil para el periodo 2040-2069 (Peterson y Shaw, 2003) así como la dispersión de dos especies de *Lutzomyia* y cuatro especies de reservorios desde el sur de Estados Unidos hacia el norte, en 2020, 2050 y 2080 (González y col., 2010). Ambos trabajos fueron simulados bajo la premisa de los dos escenarios de emisiones de gases propuestos por el panel intergubernamental del cambio climático (IPCC *Intergovernmental panel on climate change*).

Todos estos ejemplos son una muestra de la contribución de las nuevas tecnologías al conocimiento de la transmisión de la leishmaniosis a nivel local y global que jugarán, de ahora en adelante, un papel decisivo en el diseño de programas de control de la leishmaniosis y en especial de sus vectores.

II. OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es evaluar los factores, ligados o no al cambio global, que pueden estar afectando en un foco de transmisión activa de Lcan, haciendo especial énfasis en aquellos que pueden influir sobre la infección por *L. infantum* y la abundancia de los flebotomos vectores. Asimismo se aplicarán técnicas de análisis espacial para la elaboración de modelos y mapas predictivos del vector como indicadores del riesgo de expansión y/o aparición de la Lcan.

Este estudio sobre la leishmaniosis canina y sus vectores en la Comunidad de Madrid y algunas áreas limítrofes se estructura en tres partes:

II.1. ESTUDIO DEL RESERVORIO CANINO:

- II.1.1. Determinar la seroprevalencia actual de la Lcan en la zona de estudio.
- II.1.2. Evaluar el cambio acaecido en la seroprevalencia de la Lcan comparando los resultados con un estudio histórico realizado varios años antes (Amela y col., 1995).
- II.1.3. Determinar los factores de riesgo que influyen sobre la infección por *L. infantum* en el perro.
- II.1.4. Analizar la situación epidemiológica de la población canina estudiada.

II.2. ESTUDIO DEL FLEBOTOMO VECTOR:

- II.2.1. Determinar la abundancia y distribución actual de los flebotomos en la zona de estudio.
- II.2.2. Evaluar el cambio acaecido en la abundancia y distribución de las especies de flebotomos vectores de la Lcan comparando los resultados con un estudio histórico realizado varios años antes (Conesa Gallego, 1994).
- II.2.3. Describir la dinámica estacional de los flebotomos en la zona de estudio.
- II.2.4. Determinar los factores de riesgo que influyen sobre la abundancia de las especies de flebotomos vectores de la Lcan.

II.3. CONSTRUCCIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS ESPACIALES Y TEMPORALES DEL FLEBOTOMO VECTOR:

- II.3.1.** Inferir modelos de regresión múltiple desarrollados a partir de variables medioambientales y meteorológicas en mapas de abundancia de las especies de flebotomos vectores.
- II.3.2.** Validación de los mapas obtenidos a través de la cercanía a casos geocodificados de Lcan.
- II.3.3.** Desarrollar mapas de riesgo temporal mediante simulaciones de la dispersión de los flebotomos vectores bajo la premisa del futuro cambio climático.

III. MATERIAL Y MÉTODOS



III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ÁREA GEOGRÁFICA DE ESTUDIO

Para llevar a cabo el presente estudio fue seleccionada un área de la zona central de España, situada en la Comunidad Autónoma de Madrid (40° 22' N y 3° 43' O) y algunas áreas limítrofes. El muestreo se realizó a lo largo de una franja que se extiende desde el noreste al suroeste, e incluye parte del Sistema Central y de la Meseta Central (Submeseta Sur).

Este área se incluye en la región bioclimática Mediterránea cuyas principales características son la existencia de un periodo de sequía estival y la presencia de los valores máximos de precipitación en otoño y primavera. La escasa influencia marítima unida a la existencia de cadenas montañosas que actúan de pantalla, provocan la disminución de la humedad relativa del aire y de la inercia térmica en esta zona del interior de la Península Ibérica, acentuándose así el carácter continental del clima mediterráneo. Este clima mediterráneo continentalizado presenta temperaturas muy extremas con inviernos más fríos y veranos más cálidos (López González, 2004).

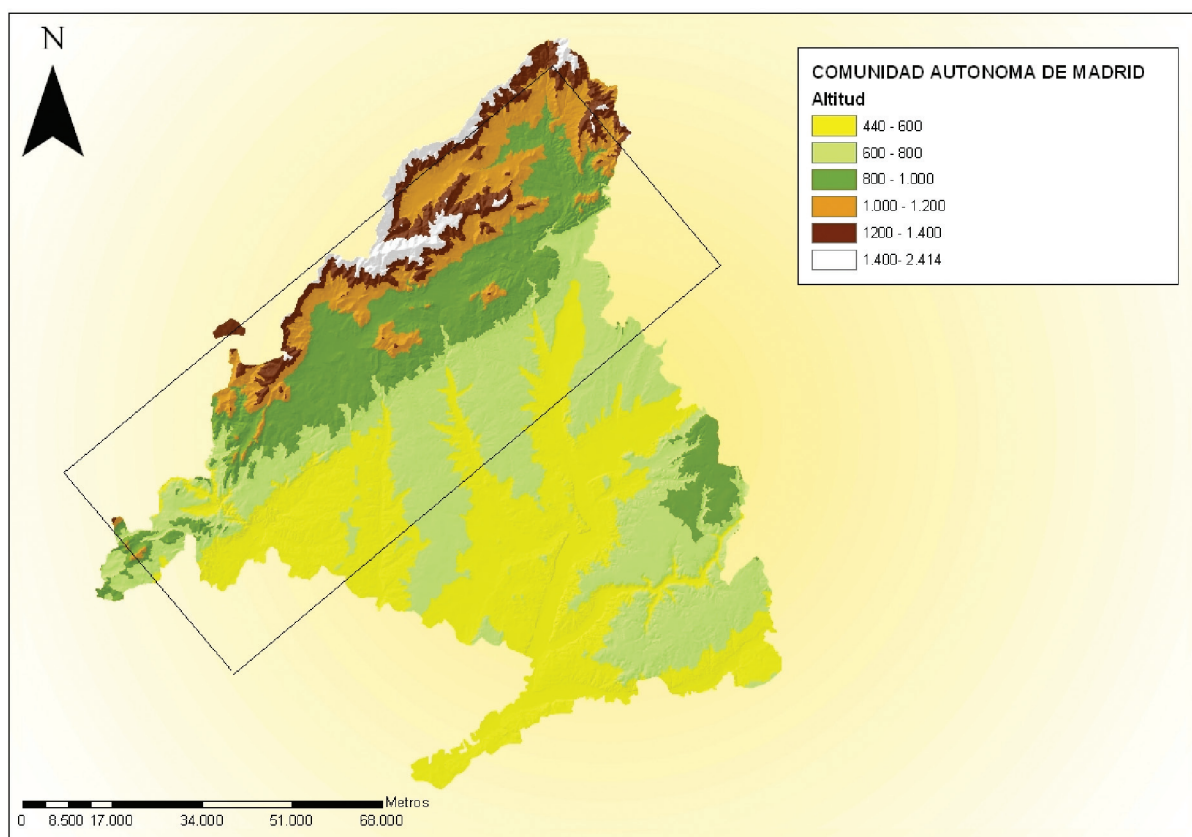


Figura III.1. Mapa de la Comunidad de Madrid: Área de estudio seleccionada.

El rango altitudinal estudiado osciló entre 440 y 2414 m. A medida que aumenta la altitud, se observa una disminución de la temperatura media y un incremento de las precipitaciones por el efecto condensador de los vientos cargados de humedad. Ello se traduce en un cambio de vegetación que se presenta mediante una alternancia altitudinal de pisos. La alternancia de bosques de hoja perenne seguidos en altitud por bosques caducifolios, y éstos por coníferas y matorrales de alta montaña, es característica de las montañas mediterráneas de la Península Ibérica. El área elegida se caracteriza por abarcar una gran variabilidad altitudinal, lo que determina a su vez una gran diversidad de variables como la temperatura, la precipitación o la vegetación, que podrían llegar a ser determinantes en la distribución del vector y en consecuencia de la Lcan (Figura III.1).

Tras situar la zona geográfica estudiada y sus características, y debido a la exposición de la presente Tesis Doctoral en formato de publicaciones, se remite al lector a cada uno de los apartados específicos de "Material y métodos" de los capítulos 1, 2 y 3 del epígrafe "Resultados".

IV. RESULTADOS



CAPÍTULO 1

*Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis
in the Madrid region (central Spain)*



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

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

Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain)

R. Gálvez^a, G. Miró^b, M.A. Descalzo^c, J. Nieto^a, D. Dado^b, O. Martín^a, E. Cubero^a, R. Molina^{a,*}

^aServicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

^bDepartamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^cUnidad de Investigación, Fundación Española de Reumatología, c/Marqués del Duero, 5, 28001 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2009

Received in revised form 23 November 2009

Accepted 26 November 2009

Keywords:

Canine leishmaniosis

Seroprevalence

Risk factors

Madrid

Immunofluorescent antibody test

ABSTRACT

This report describes a cross-sectional serological survey of the epidemiology of canine leishmaniosis (CanL) performed in 2006 and 2007 in the Madrid region (central Spain) where the disease is endemic. The work presented here is one of the several studies conducted in different Spanish regions under the Integrated Project of the European Commission entitled Emerging Diseases in a changing European eNvironment (EDEN). The aim of this project is to identify and catalogue European ecosystems and environmental conditions that determine the spatial and temporal distributions and dynamics of several pathogenic agents including *Leishmania infantum* (EDEN-LEI). The study area (Madrid Autonomous Region) was selected on the grounds of its wide altitude range. This area was surveyed from NE to SW across its mountain range (Sistema Central) and plateau area. One thousand and seventy-six dogs from 32 villages were examined for clinical signs of CanL, and serum samples were obtained to determine several haematological and biochemical variables. Leishmaniosis-specific antibodies were identified using an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT). 87 of the 1076 dogs were seropositive for the protozoan (IFAT: cut-off $\geq 1/80$) indicating a seroprevalence of 8.1% (0–16.1% depending on the village). On the basis of a physical examination and the biochemical/haematological status of each dog, 32 of the 87 infected dogs were described as clinically healthy (37%). Seroprevalence showed a peak in young dogs (1–2 years) and a second larger peak among the older dogs (7–8 years). Factors correlated with a higher infection risk were age (OR = 1.15 [95% CI: 1.07–1.22]), weight (OR = 1.10 [95% CI: 1.04–1.16]), and living outdoors as opposed to in a home (OR = 3.38 [95% CI: 1.42–8.05]). According to data from studies performed in 1992 in the same area, the seroprevalence of CanL has increased 1.54-fold [95% CI: 1.04–2.29]. Given that this increasing trend cannot be attributed to differences in the sociodemographic characteristics of the dog populations, it is proposed that environmental changes could have had an impact on vector and reservoir densities and their geographical distributions. Further studies designed to explain this trend should attempt to correlate sand fly densities and CanL seroprevalences with climate, land use and human changes.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* is a widespread zoonotic disease that is endemic in the Mediterranean basin. The dog is the main domestic

* Corresponding author. Tel.: +34 91 8223674; fax: +34 91 5097034.
E-mail address: rmolina@isciii.es (R. Molina).

reservoir for human infection by *L. infantum* (Alvar et al., 2004). Infected dogs, whether clinically healthy or sick, are infectious for phlebotomine sand flies (Molina et al., 1994). This determines that the infection seroprevalence in endemic areas is considerably higher than the rate of apparent clinical illness (Baneth et al., 2008). *L. infantum* is transmitted to humans and animals by blood-sucking phlebotomine sand flies, *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi* being the proven vectors for the parasite in Spain (Rioux et al., 1986; Lucientes Curdi et al., 1988; Martín-Sánchez et al., 1994; Molina et al., 2005).

In the Madrid Autonomous Region, leishmaniosis is the most common zoonotic disease that afflicts infants (aged 0–4 years) and also frequently affects patients with HIV infection (BECM, 2005). The main vector for the parasite in the Madrid region is *P. perniciosus*.

Many cross-sectional serological surveys have served to improve current understanding of the epidemiology of leishmaniosis, though changing trends and the spread of canine leishmaniosis (CanL) make the epidemiology of this zoonosis particularly challenging (Baneth et al., 2008; Miró et al., 2008). The impacts of the sex, breed, age, use and habitat of the dog host on the emergence of this disease have been explored in several epidemiological surveys, though results have been inconsistent due to many varying factors such as the serological techniques and antibody titre cut-offs used, the sociodemographic features of dogs, and sample sizes, among many others. Effectively, without efficient standardizing of methods, it is difficult to compare

the results of these surveys. Estimates of CanL seroprevalence reported for Spain range from 3.7% for Orense in the northwest corner of the country (Amusatégui et al., 2004) to 34.6% for Malaga on the south coast (Morillas et al., 1996).

In a context of emerging and/or re-emerging diseases, the present survey was designed to identify risk factors for CanL infection and describe recent trends in its seroprevalence in the Madrid region.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study was performed in Madrid, central Spain (40°22'N and 3°43'W). The altitude of this region varies from 491 to 2400 m. The climate and vegetation are typically Mediterranean, with dry, hot summers and maximum rainfall recorded in autumn and spring. The Madrid Autonomous Region was surveyed across a band spanning northeast to southwest including its mountain range (Sistema Central), foothills and plateau (Fig. 1). This area was chosen because of its wide altitude range, which could determine the distribution of CanL.

2.2. Data collection and laboratory diagnostics

The cross-sectional study was conducted between late May and early July of 2006 and 2007. Dogs were enrolled

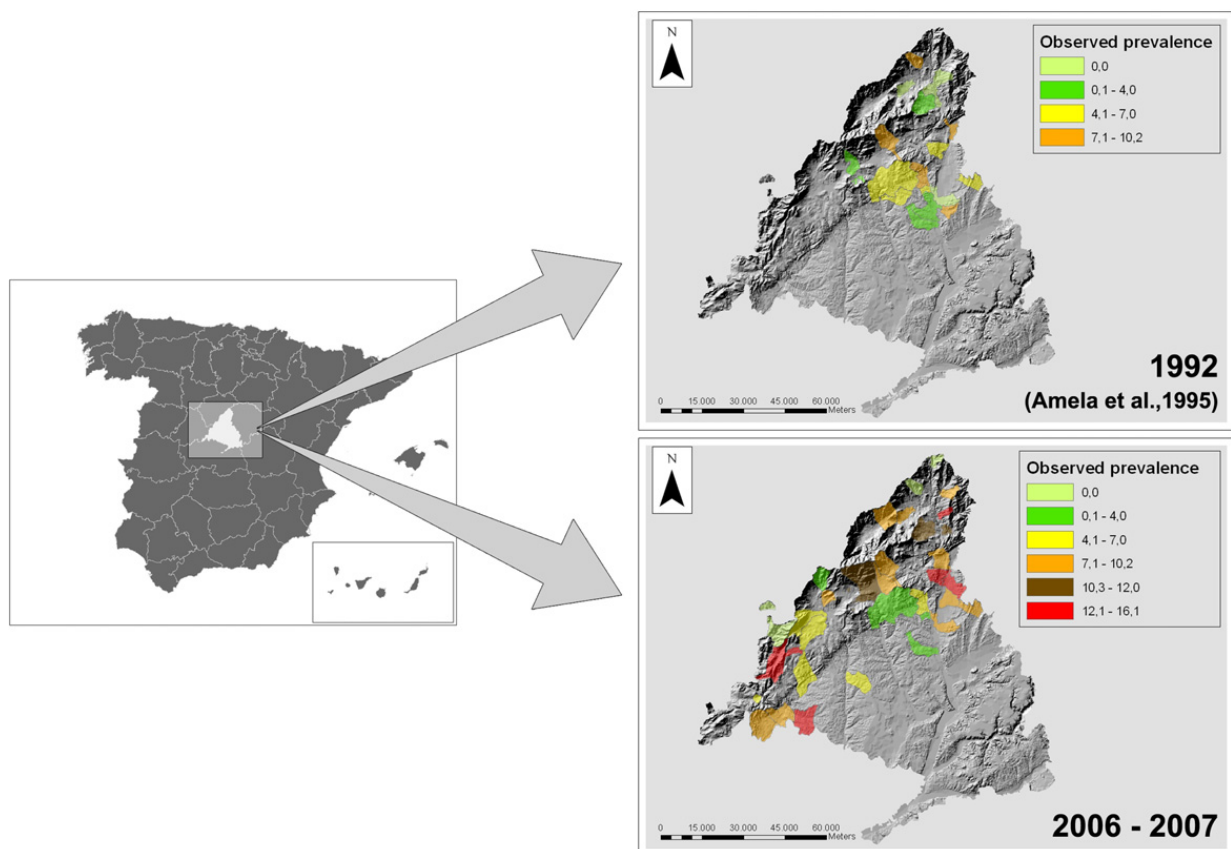


Fig. 1. Location of the study area in Spain and geographic distribution of canine leishmaniosis seroprevalence in villages at different altitudes in the Madrid Autonomous Region determined in the present survey and in a survey conducted in 1992.

during a compulsory rabies vaccination programme in 32 villages of the Madrid Autonomous Region. These villages were selected such that each of the following altitude ranges was represented by a similar number of villages: 400–600, 601–800, 801–1000 and 1001–1500 m. The number of dogs examined from each village ranged from 20 to 50.

A 5 ml blood sample was obtained from each dog by cephalic or jugular venipuncture and sera were separated and kept at -20°C until analysis. In addition, each dog was examined by a veterinarian who recorded its clinical signs. Serodiagnosis was conducted by detecting specific antibodies against *L. infantum* using the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) according to standard procedures (Alvar et al., 2004). This technique is based on detecting *L. infantum* MON-1 (reference strain MHOM/FR/78/LEM-75) promastigotes. Serial dilution established were 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 and $>1/640$. The conjugate used was Rabbit anti-dog IgG (H + L) Affin., Fite-Conjugated, ICN. The cut-off value indicating a positive result was set at 1:80, which is the internationally accepted IFAT limit (Fernández-Pérez et al., 1999; Maia and Campino, 2008). Seroprevalence was calculated as the percentage of dogs testing positive for *L. infantum* antibodies. A second collected blood sample was used to determine several haematological and biochemical variables.

For each animal, the variables name, age, breed, sex, weight, lifestyle and use given were recorded. Additionally, owners were asked about their knowledge about CanL and whether they applied topical insecticides against sand flies to their dogs.

2.3. Statistical analysis

The population sample was described in terms of distributions of continuous (mean \pm standard deviation) and categorical variables (percentages). The Mann–Whitney, X^2 and Fisher's exact tests were used to analyse relationships between seroprevalence and the remaining variables.

Risk factors for leishmaniosis infection were determined through logistic regression models. Bivariate analysis was performed on all factors and then, through backward stepwise selection, a multivariate model was constructed, starting with all variables returning a *p*-value lower than 0.2 in the bivariate analysis. Interactions between factors and covariates were evaluated in the final model. The risk factors considered were: survey year, sex, age, weight, breed, breed size, place of abode, sleeping habits, habitat type, altitude and landscape, number of dogs living together, use given to the dog, presence of leishmaniosis signs and owner's knowledge of the disease. Results were expressed as odds ratios (ORs). Goodness-of-fit was assessed using the Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit statistic. Finally, to validate the model a set of 1000 bootstrapped samples for the area under the ROC curve (AUC) estimator was computed at a 95% normal confidence interval (Gould, 1994).

The ratio of proportions was calculated as an effect of a measure of the change to compare seroprevalence data with those previously obtained for the same region by

Amela et al. (1995) who used the same diagnostic method (IFAT) and cut-off ($\geq 1:80$). The ratio of proportions was first determined unadjusted and then adjusted for age, weight and use of the dog. The force of infection, λ , and the basic case reproduction number, R_0 , were also estimated as in Amela et al. (1995) using the log-linear approach for λ and the formulas described for R_0 by Dye et al. (1992).

All analyses were performed using Stata v. 10.0 software (Stata Corporation, College Station, TX, 2008).

3. Results

3.1. Descriptive analysis

3.1.1. Features of the dog population

Over the years 2006 and 2007, 1076 dogs were examined in 32 villages of the Madrid region. By year, 454 dogs from 14 villages (42%) were surveyed in 2006 and 622 dogs (58%) from 18 localities in 2007. The altitudes of the villages included in the study varied from 476 to 1460 m above sea level (mean 855 m; SD, standard deviation: 235 m). Seroprevalences for the 32 villages ranged from 0 to 16.1% (Fig. 1). The features of the dogs recorded are provided in Table 1. Mean age and weight were 5.2 years (SD: 3.4) and 19.0 kg (SD: 14.2), respectively. Two main characteristics of the population sample were that 579 (54%) were female and breed size was large in 462 (71%). The most frequently observed breeds were mongrels (411 dogs, 39%), the Spanish hound Podenco (77 dogs, 7%) and German Shepherd (68 dogs, 6%).

3.1.2. Sociodemographic and epidemiological variables

Table 1 shows the sociodemographic and epidemiological variables determined. Most of the dogs lived outdoors (706) as opposed to in a home (256) although almost the same proportions of the dogs spent the night indoors and outdoors, 48% and 52%. The uses given to the dogs were 97 guard dogs (9%), 280 hunting dogs (26%) and 672 pets (63%). Each dog was assigned a habitat and landscape category based on the village where they lived. Thus, 502 dogs lived in a peri-urban habitat (47%), 367 in a rural habitat (34%) and 207 in an urban habitat (19%), and 85 (8%) of the dogs lived in villages set in a hilly landscape, 634 dogs (59%) lived in mountain villages and the villages inhabited by 357 of the dogs (33%) were located in a flatland area. The data obtained from the dog owners revealed that 770 owners had heard of visceral leishmaniosis (73%), 358 (36%) were aware of protective measures against sand fly bites and 274 (28%) claimed to use such measures.

3.1.3. Clinical study

Specific anti-*Leishmania* IgG antibodies (antibody titre $\geq 1/80$) were detected in 87 of the 1076 dogs, rendering a seroprevalence of 8.1% [95% confidence interval: CI (6.5–9.7)]. A clinical examination revealed that only 29 of the 87 dogs testing positive for the parasite showed clinical signs consistent with CanL (33%). The signs detected were mainly lymphadenomegaly, skin lesions and cachexia. 43 of the 87 seropositive dogs had clinicopathological disorders (49%), essentially

Table 1
Main factors examined in the present survey of canine leishmaniosis (2006–2007).

	N (%)
Year	
2006	454 (42)
2007	622 (58)
Sex	
Female	579 (54)
Male	493 (46)
Age in years, mean (SD)	5.2 (3.4)
Weight (kg), mean (SD)	19.0 (14.2)
Breed size	
Large	462 (71)
Medium	42 (6)
Small	145 (22)
Abode	
Kennel	107 (10)
In the home	256 (24)
Outdoors	706 (66)
Habitat	
Peri-urban	502 (47)
Rural	367 (34)
Urban	207 (19)
Altitude (m), mean (SD)	855 (235)
Landscape	
Hilly	85 (8)
Mountainous	634 (59)
Flatland	357 (33)
Sleeping habits	
Indoors	516 (48)
Outdoors	549 (52)
Lives with other dogs	
Yes	650 (61)
No	422 (39)
Use given	
Guard dog	97 (9)
Hunting dog	280 (26)
Pet	672 (63)
Other	22 (2)
Owner has knowledge of leishmaniosis	770 (73)
Owner has knowledge of topical insecticides	358 (36)
Owner uses topical insecticides	274 (28)

Abbreviations: N, number of dogs; SD, standard deviation; kg, kilograms; m, meters.

hyperproteinemia (especially hypergammaglobulinemia), uremia, leukocytosis and anaemia. 63% of these seropositive animals (55 out of 87) presented both a clinicopathological disorder and/or clinical signs of CanL.

3.2. Bivariate analysis

Bivariate analysis was performed to analyse relationship between seroprevalence and the remaining factors. The results of the bivariate analysis of risk factors for CanL appear in Table 2. The mean age and weight of seropositive dogs were 6.6 years (SD: 3.4) and 26.7 kg (SD: 14.3), respectively, the OR of having CanL being statistically significant for both variables ($p < 0.001$). This means that

for each 1-year increase in age or 1-kg increase in weight the risk of having the disease increased by a factor of 1.13 [95% CI (1.06–1.2)] or 1.03 [95% CI (1.02–1.05)], respectively. The seroprevalence recorded in females (7%) was lower than in males (10%), but the OR of 1.42 [95% CI (0.91–2.2)] was not significantly different. Significant differences in the CanL risk were detected for breed size ($p < 0.01$), with small size being a protective factor (OR = 0.24 [95% CI (0.08–0.67)]) compared to a large size for the breed as the reference category. According to the dog use categories, guard dogs showed a greater risk of infection ($p < 0.001$) compared to dogs kept as pets, with an OR = 3.2 [95% CI (1.8–5.8)], while the other groups failed to differ. By place of abode, the *L. infantum* seroprevalence of dogs that lived outside (10%) significantly differed ($p < 0.001$) to that recorded for the dogs that lived at home (3%) with an OR = 4.17 [95% CI (1.89–9.17)]. Spending the night outdoors (11%) appeared as a risk factor (OR = 2.31 [95% CI (1.44–3.73)]) showing a significant difference ($p < 0.001$) when compared to the dogs that slept indoors (5%). The seroprevalence observed for the peri-urban habitat was slightly higher (9%) than that observed in the rural (8%) and urban (5%) habitats yet not significantly. The remaining factors determined such as landscape or altitude of the village inhabited by the dogs, along with the owners' background knowledge of leishmaniosis or use of topical insecticides against sand flies were not associated with seroprevalence.

3.3. Multivariate analysis and model validation

The following variables showed a $p \leq 0.2$ in the bivariate analysis and were thus introduced in the multivariate analysis: sex ($p = 0.117$), age ($p = 0.000$), weight ($p = 0.000$), place of abode ($p = 0.000$), habitat ($p = 0.150$), sleeping habits ($p = 0.000$) and use ($p = 0.001$). The final model revealed that age, weight and abode showed an effect on seroprevalence with no interactions (Table 2.). Bootstrapping indicated a good classification accuracy, area under ROC curve = 0.75 and 95% percentile confidence interval (0.70–0.81). For each 1-year age increase the OR went up by 1.15 [95% CI (1.07–1.22)] ($p < 0.001$), and for every kilogram more of weight the OR rose by 1.1 [95% CI (1.04–1.16)] ($p < 0.001$). Finally, living outdoors was correlated with a 3.38-fold greater risk of infection [95% CI (1.42–8.05)] ($p < 0.01$) compared to living in a home.

3.4. Changes over time

To describe changes in CanL seroprevalence in the Madrid region over time, the present data were compared with those obtained in a survey conducted 15 years earlier (in 1992) in the same Madrid region (Amela et al., 1995). Seroprevalence in 1992 was 5.25, and the unadjusted ratio of proportions was 1.54 [95% CI (1.04–2.29)] ($p = 0.033$); after adjusting for age, weight and use of the dogs, this ratio increased to 1.67 [95% CI (1.09–2.56)] ($p = 0.019$). When the dogs were stratified into the six age categories described by Amela et al. (1995), age seroprevalence exhibited a similar bimodal

Table 2

Bivariate and multivariate factors associated with canine leishmaniosis (IFAT: cut-off $\geq 1/80$).

	No. (%)	Bivariate OR (95% CI)	Multivariate OR (95% CI)
<i>N</i>	87 (8)		
Year			
2006	34 (7)	Ref	
2007	53 (9)	1.15 (0.73–1.8)	
Sex			
Female	40 (7)	Ref	
Male	47 (10)	1.42 (0.91–2.2)	
Age in years, mean (SD)	6.6 (3.4)	1.13 (1.06–1.2)***	1.15 (1.07–1.22)***
Weight (kg), mean (SD)	26.7 (14.3)	1.03 (1.02–1.05)***	1.1 (1.04–1.16)***
Breed size			
Large	49 (11)	Ref	
Medium	5 (12)	1.14 (0.43–3.03)	
Small	4 (3)	0.24 (0.08–0.67)**	
Abode			
In the home	7 (3)	Ref	Ref
Kennel	6 (6)	2.11 (0.69–6.44)	2.93 (0.84–10.2)
Outdoors	74 (10)	4.17 (1.89–9.17)***	3.38 (1.42–8.05)**
Habitat			
Peri-urban	46 (9)	Ref	
Rural	31 (8)	0.91 (0.57–1.47)	
Urban	10 (5)	0.5 (0.25–1.02)	
Altitude (m), mean (SD)	800 (200)	0.58 (0.23–1.46)	
Landscape			
Hilly	8 (9)	Ref	
Mountainous	51 (8)	0.84 (0.39–1.84)	
Flatland	28 (8)	0.82 (0.36–1.87)	
Sleeping habits			
Indoors	26 (5)	Ref	
Outdoors	60 (11)	2.31 (1.44–3.73)***	
Lives with other dogs			
No	34 (8)	Ref	
Yes	53 (8)	1.01 (0.65–1.59)	
Use given			
Pet	47 (7)	Ref	
Guard dog	19 (20)	3.2 (1.8–5.8)***	
Hunting dog	19 (7)	0.97 (0.56–1.68)	
Other	2 (9)	1.33 (0.3–5.86)	
Owner's			
Knowledge of leishmaniosis			
No	20 (7)	Ref	
Yes	66 (9)	1.23 (0.73–2.07)	
Knowledge of topical insecticides			
No	55 (9)	Ref	
Yes	23 (6)	0.72 (0.43–1.19)	
Use of topical insecticides			
No	58 (8)	Ref	
Yes	18 (7)	0.76 (0.44–1.32)	

Abbreviations: *N*, number of seropositive dogs; OR, odds ratio; Ref, reference category; SD, standard deviation; m, meters; kg, kilograms.** $p < 0.01$.*** $p < 0.001$.

distribution. Hence, seroprevalence peaked in young dogs (1–2 years) and a second larger peak was observed in the older dogs (7–8 years) (Fig. 2). When comparing seroprevalences stratified by age between surveys, every age group in the present study showed a higher seroprevalence than in the 1992 survey with a greater

difference detected between the two populations of older dogs. The estimated force of infection λ for working dogs was 0.030 and 0.019 for pets. Assuming the proportion of infected sand flies is negligible, the basic reproductive number R_0 was 1.09 or 1.10 depending on the homogeneity of biting rates.

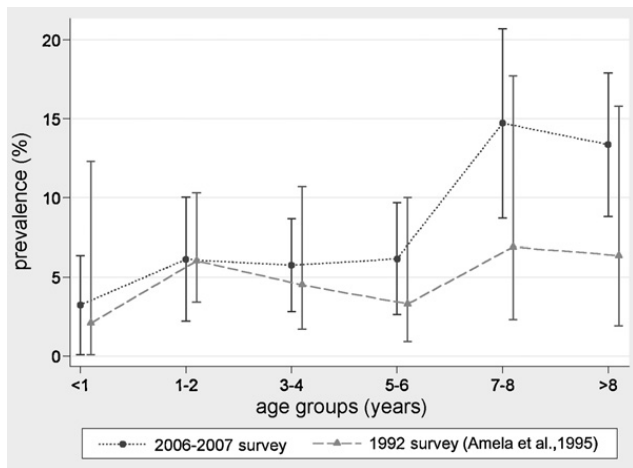


Fig. 2. Seroprevalence (95% confidence intervals) of canine leishmaniasis by age recorded in two surveys (1992 and 2006–2007).

4. Discussion

The findings of this survey reveal a greater seroprevalence of CanL in the non-stray dogs of the Madrid region (8.1%) compared to the few surveys conducted in this area using the same diagnostic method (IFAT) and the same cut-off ($\geq 1:80$) to indicate seropositivity. Seroprevalences reported in these past surveys were 5.25% in rural and peri-urban habitats (Amela et al., 1995), 4.7% in urban habitats (Castañeda et al., 1999) and 4.7% in both urban and peri-urban habitats (Celaya, 1993). However, comparisons are hindered by the different characteristics of the studies (sample sizes and dog selection methods) and the different durations of the surveys. The seroprevalence reported here is lower than the 11.2% rate observed in stray dogs (Miró et al., 2007) of the Madrid region in 2006. This difference in infection rates between stray dogs and dogs with owners could be the outcome of the outdoor lifestyle of stray dogs involving an increased exposure to sand flies (Dye et al., 1992; Amusatogui et al., 2004) and a lack of preventative control measures.

A significantly higher seroprevalence, mainly among the older dogs, was observed in Madrid compared to the rates reported in historical surveys, such that the present risk is as much as 1.54 times greater (Fig. 1). This increase could be attributed to differences in the sociodemographic characteristics of the dog populations. However, when the proportion ratio was adjusted for age, weight and the use given to the dog, this risk increase went up to 1.67 indicating that these variables are not likely to affect the seroprevalence differences among surveys. The homogeneous/non-homogeneous basic reproductive number increased from the value of 1.06/1.07 reported in the survey by Amela et al. (1995) to the 1.09/1.10 obtained in the present study. This increase reflects enhanced transmission of the disease. Increased seroprevalence and transmission of CanL could have been provoked by changes in the environment including land use changes that have probably led to increased densities both of vectors and reservoirs, as well as variations in their geographical distribution. Today's improved clinical management leading to a greater longevity of sick dogs is probably why the seroprevalence

increase mainly affects older dogs. In Portugal, a considerable increase in the seroprevalence of CanL has been detected in the last 10 years comparing surveys carried out in the same areas. This increase has been attributed by some authors to an augmented phlebotomine sand fly population arising from environmental changes (Cardoso et al., 2004). Since the late 1980s, western Sicily and the Aeolian islands (Italy) have also experienced a rise in the prevalence of CanL (Maroli et al., 1990). In Tunisia, the increase in CanL seroprevalence observed over the past decades has spread from northern areas southward to areas that were non-endemic (Chargui et al., 2007).

When infection forces in pet/working dogs were compared in the present and historical surveys, this variable was observed to have fallen over the years from 0.059/0.035 to 0.019/0.03. The marked decrease in the proportion of healthy dogs that become infected, mainly pets, can be explained by an improved lifestyle. Thus, better preventative control measures and the improved management of ill dogs are probably the reasons why fewer healthy dogs become infected. In central Italy, a reduced incidence in CanL over a 4-year period was achieved using both therapeutic measures (antimonials and allopurinol) and preventive spot-on measures (imidacloprid/permethrin) (Podaliri-Vulpiani et al., 2009).

The distribution of leishmaniasis is determined by its vector and reservoir host, and these limiting factors lead to specific environmental requirements, focusing disease distribution (Ashford, 2000). The altitudes of the villages surveyed here ranged from 476 to 1434 m above sea level and large differences in seroprevalence among each location were noted. Despite the fact that differences in seroprevalence could not be correlated with altitude, no seropositive dogs were observed in the three highest villages: Santa Maria de la Alameda (1460 m), Somosierra (1434 m), and Robregordo (1299 m). In the study area, these villages showed the lowest vector densities or even the absence of the sand fly. Thus, it is unlikely that transmission takes place at altitudes higher than 1300 m a.s.l. Traditionally, the distribution of CanL has been described to follow a gradient in the morbidity of dogs from the coast to mountainous regions (Lanotte et al., 1978), with altitude being a limiting factor. Nonetheless, no significant seroprevalence variation was detected between villages located in lowlands and villages on hillside slopes of up to 1300 m. Neither was a relationship between seroprevalence and altitude found in a survey performed in Croatia (Zivicnjak et al., 2005). The findings of two surveys conducted in the same localities of the French Pyrenees in 1994 and 2007 indicate opposing trends in CanL seropositive rates determined by the village landscape. Thus, valley villages showed a decrease from 11.67% to 2.72% and foothill villages an increase from 1.43% to 11.32%. The seroprevalence decline noted in the valleys was attributed by the authors to the extensive use in recent years of deltamethrin collars during the transmission season. Conversely, the seroprevalence increase in CanL infection in dogs inhabiting foothill villages was thought to be the result of today's higher temperatures since the mean annual temperature is 1 °C higher than in 1994 (Dereure et al., 2009).

The dogs testing positive for leishmaniosis in the present study (87) were either clinically healthy infected dogs (36.8%) or infected dogs showing clinical illness (63.2%). The epidemiological role of clinically healthy infected dogs in endemic areas of CanL is probably decisive for the spread of the disease. Infected dogs that lack physical or clinical signs may develop some level of cellular immunity over time, which is believed to limit disease outcome (Cabral et al., 1998). These dogs remain infected for a long period of time and are able to avoid the appearance of lesions and clinical disease (Baneth et al., 2008). The eradication of *Leishmania* infection in dogs will thus depend on adopting effective control measures in clinically healthy infected dogs.

Dog age, weight, breed size, place of abode, sleeping outdoors and the use given to the dogs were the factors associated with the seroprevalence of CanL. The risk of infection increased with age. This correlation has also been reported in central Italy (Maresca et al., 2009) and in south-eastern Spain (Martín-Sánchez et al., 2009). Age seroprevalence showed a bimodal distribution with one peak appearing in the young dogs (1–2 years) and a second more evident peak among the older dogs (7–8 years) (Fig. 2). This distribution pattern has been reported by others (Abranches et al., 1991; Amela et al., 1995; Miranda et al., 2008) and can be explained by the fact that dogs that are inherently more sensitive to the disease will develop it at an early age, whereas in other more resistant animals, though also infected at an early age, latent infection will not be activated until they are older and their immune system decays.

A lower weight and small size emerged as protective factors for the development of infection. This could be attributed to a larger weight/size determining a greater body surface area susceptible to sand fly bites. Apart from this, it is known that small dogs are more likely to live indoors, which acts as a protection factor. In a recent study, Martín-Sánchez et al. (2009) also observed that CanL seroprevalence increases gradually with weight. The dogs examined here showed a significantly higher seroprevalence if they lived in the open (10%) than if they lived in a kennel (6%) or home (3%). Significant differences were also detected in dogs that spent the night outdoors (11%) compared to those kept indoors (5%). According to the analysis of these two variables (abode and sleeping habits) an outdoor lifestyle is significantly associated with serological positivity for the parasite. The explanation for this could lie in the increased exposure of dogs that spend more time outdoors to phlebotomines. In western Liguria (Italy), lifestyle was the main risk factor for infection by *L. infantum* identified, with dogs spending the night outdoors described as more susceptible to infection (Zaffaroni et al., 1999). In the recent survey performed in Granada (Spain), spending the night outdoors emerged as the greatest risk factor for CanL (Martín-Sánchez et al., 2009). Dogs that are kept outside by their owners, such as guard dogs, are likely to be longer exposed to sand flies.

The sand fly population and hence the prevalence of CanL in southwestern Mediterranean countries may be expanding due to human impacts, environmental

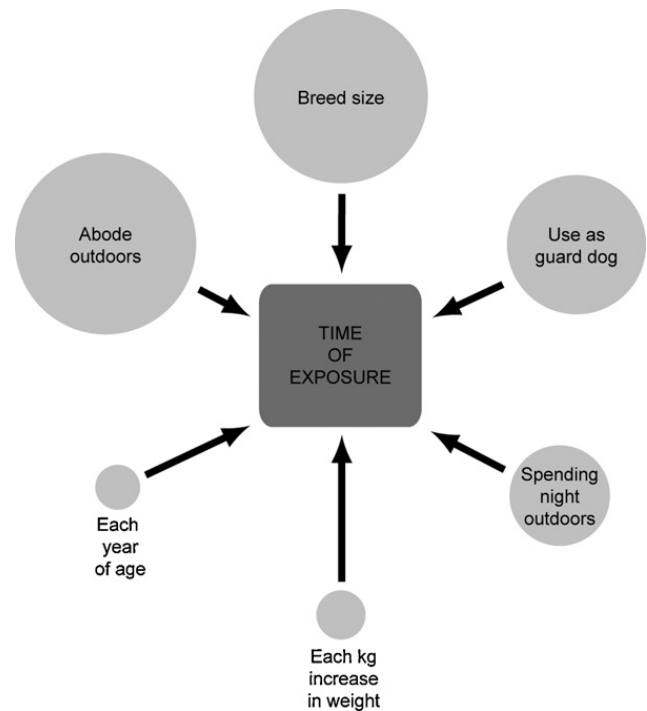


Fig. 3. Risk factors for canine leishmaniosis. The diagram illustrates the relative sizes (indicated by bivariate analysis OR values) of the risk factors correlated with time of exposure to sand fly bites.

changes and climate warming. Further studies should try to link changing patterns of sand fly densities and CanL seroprevalences to climate, human and environmental modifications.

5. Conclusion

Recent research efforts indicate the extensive distribution and expansion of CanL across large areas of the world. In the Madrid region, where CanL is endemic, a significant increase in the seroprevalence and transmission of the parasite was detected with respect to surveys conducted 15 years ago. Spatial analyses of environmental factors that affect both the vectors and reservoirs of CanL are required to explain this trend. In contrast, a lower infection rate was observed in healthy pet dogs, probably because these dogs are better cared for and are thus exposed to fewer risks of contracting the disease. The risk factors for CanL seropositivity identified in the present survey were correlated with a longer time of exposure to sand fly bites (Fig. 3). The control of CanL in endemic areas must be based on the widespread adoption of measures targeted at preventing new infections, such as the use of topical insecticides, clinical management, adequate care of dogs and future immunoprophylaxis. Although considerable progress is being made in the clinical management and development of topical insecticides, vaccine candidates to prevent canine infection in Europe are not yet available.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The first author was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III belonging to the Spanish Ministry of Innovation & Science. The results obtained are part of the Ph.D. dissertation of Gálvez, R. This publication was supported by EDEN (project: GOCE-2003-010284) and is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0177 (www.eden-fp6project.net). The contents are the sole responsibility of the author and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

The authors thank the owners of the dogs and veterinarians for their collaboration. Jorge Barón helped with the design of the figures. Irene Mata collaborated in the field work. We would like to dedicate this study to the memory of Clive Davies, who sadly passed away during the course of the EDEN project.

References

- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C., Conceicao-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.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Amela, C., Méndez, I., Torcal, J.M., Medina, G., Pachón, I., Cañavate, C., Alvar, J., 1995. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 157–161.
- 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.
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269–1281.
- 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.
- BECM, 2005. Zoonosis. Comunidad de Madrid, años 2002–2004. *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid* 11, 47–77.
- Cabral, M., O'Grady, J.E., Gomes, S., Sousa, J.C., Thompson, H., Alexander, J., 1998. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 76, 173–180.
- Cardoso, L., Schallig, H.D., Neto, F., Kroon, N., Rodrigues, M., 2004. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.* 91, 95–100.
- Castañeda, R., Carpio, I., Asensio, A., Alberdi, J.C., García, S., Domínguez, T., Moreno, S., 1999. Estudio de seroprevalencia de la leishmaniasis canina en perros censados en Madrid. *Consulta de difusión veterinaria* 7, 836–841.
- Celaya, C., 1993. Estudio epidemiológico descriptivo de la leishmaniasis canina en un entorno periurbano de la ciudad de Madrid. *Veterinaria en Madrid* 5, 13–15.
- Chargui, N., Haouas, N., Gorcii, M., Akrouit Messaidi, F., Zribi, M., Babba, H., 2007. Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite* 14, 247–251.
- Dereure, J., Vanwambeke, S.O., Male, P., Martínez, S., Pralong, 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.* (Larchmont, N. Y.), doi:10.1089/vbz.2008.0126.
- Dye, C., Killick-Kendrick, R., Vitutia, M.M., Walton, R., Killick-Kendrick, M., Harith, A.E., Guy, M.W., Cañavate, M.C., Hasibeder, G., 1992. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology* 105 (Pt 1), 35–41.
- Fernández-Pérez, F.J., Méndez, S., de la Fuente, C., Gómez-Muñoz, M.T., Cuquerella, M., Alunda, J.M., 1999. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 652–653.
- Gould, W., 1994. Faster and easier bootstrap estimation. *Stata Tech. Bull.* 21, 24–33.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Croset, H., Vollhardt, Y., 1978. Ecology of leishmaniasis in southern France. 9. Sampling methods in the study and analysis of canine enzootic leishmaniasis. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 53, 33–45.
- Lucientes Curdi, J., Sánchez Acedo, C., Castillo Hernández, J.A., Estrada Peña, A., 1988. Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniasis de Zaragoza. *Rev. Iber. Parasitol.* 48, 7–8.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158, 274–287.
- Maresca, C., Scoccia, E., Barizzone, F., Catalano, A., Mancini, S., Pagliacci, T., Porrini, M., Principato, M., Venditti, G., Grelloni, V., 2009. A survey on canine leishmaniasis and phlebotomine sand flies in central Italy. *Res. Vet. Sci.* 87, 36–38.
- Maroli, M., Lavagnino, A., Ansaldi, G., Cavallini, C., 1990. Indagine sui vettori di leishmaniosi (Diptera, Psychodidae) in tre differenti ambienti della Sicilia occidentale e in due delle Isole Eolie. *Parassitologia* 32, 305–311.
- Martín-Sánchez, J., Guilvard, E., Acedo-Sánchez, C., Wolf-Echeverri, M., Sanchís-Marín, M.C., Morillas-Marquez, F., 1994. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 24, 405–408.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F., 2009. Canine Leishmaniasis in the Alpujarras (South-eastern Spain): changes over the past two decades and risk factors. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 795–798.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., Ramis, A., 2008. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. *Res. Vet. Sci.* 85, 35–38.
- Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., Caballero, M.J., Molina, R., 2007. A leishmaniasis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitol. Res.* 101, 253–257.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G., Baneth, G., 2008. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 24, 371–377.
- 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. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 491–493.
- Molina, R., Aransay, A., Nieto, J., Cañavate, C., Chicharro, C., Sans, A., Flores, M., Cruz, I., García, E., Alvar, J., 2005. The phlebotomine sand flies of Ibiza and Formentera islands (Spain). In: Fifth International Symposium on Phlebotomine Sandflies (ISOPS 5), vol. 82, Tunisia, April 2005. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, p. p.12.
- Morillas, F., Sánchez Rabasco, F., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocaña-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchís-Marín, M.C., 1996. Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region. Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol. Res.* 82, 569–570.
- Podaliri-Vulpiani, M., Iannetti, L., Di Mattia, T., Dalla-Villa, P., 2009. *Leishmania infantum* in a Central Italy dog shelter: retrospective study of serologic reactivity during a 4-year period in a confined dog population subjected to preventive and therapeutic treatment. *Vet. Parasitol.* 160, 190–197.
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Gallego, J., Moreno, G., Pralong, F., Portús, M., Rispaill, P., Gallego, M., Bastien, P., 1986. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer: Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). In: IMEEE (Eds.), *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Éco-Épidémiologiques*, Montpellier, pp. 439–444.
- Zaffaroni, E., Rubaudo, L., Lanfranchi, P., Mignone, W., 1999. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis [correction of leishmaniosis] in Western Liguria (Italy). *Vet. Parasitol.* 81, 11–19.
- Zivcinkjak, T., Martinkovic, F., Marinculic, A., Mrljak, V., Kucer, N., Matijatko, V., Mihaljevic, Z., Baric-Rafaj, R., 2005. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet. Parasitol.* 131, 35–43.

CAPÍTULO 2

*Seasonal trends and spatial relations between
environmental/meteorological factors
and leishmaniosis sand fly vector abundances
in Central Spain*



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

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

Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain

R. Gálvez^a, M.A. Descalzo^c, G. Miró^b, M.I. Jiménez^a, O. Martín^a,
F. Dos Santos-Brandao^a, I. Guerrero^d, E. Cubero^a, R. Molina^{a,*}

^a Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220, Majadahonda, Madrid, Spain

^b Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

^c Unidad de Investigación, Sociedad Española de Reumatología, c/Marqués del Duero, 5, 28001 Madrid, Spain

^d Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, C/Darwin, 2, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 18 February 2010

Keywords:

Canine leishmaniosis

Sand fly vector

Phlebotomus perniciosus

Phlebotomus ariasi

Environmental and meteorological factors
Spain

ABSTRACT

This paper reports on an entomological survey performed over the period 2006–2008 in Central Spain (mainly in the Madrid province) where canine leishmaniosis (CanL) is endemic. The study area was selected on the grounds of its wide altitude range, which determines both broad climate and vegetation ranges that could affect sand fly distributions. This area was surveyed from NE to SW across its mountain range (Sistema Central) and plateau area using sticky traps mainly on embankments. In 2006 and 2007, 123 sites were sampled (9557 sand flies captured) to establish possible relations between environmental or meteorological factors and vector densities (*Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi*). The factors correlated with higher vector densities were: a sample site between villages or at the edge of a village, the lack of a paved road, a rural habitat, an east or south-facing wall or wall sheltered from the wind, the presence of livestock or birds, a holm-oak wood vegetation, a lower summer mean temperature and lower annual mean precipitation. This study was followed by a seasonal survey conducted at 16 selected sites (14,353 sand flies) sampled them monthly from May to November 2008. *P. perniciosus* showed a diphasic seasonal trend with two abundance peaks in July and September whereas *P. ariasi* showed a monophasic trend with one peak in August. Comparing with data from studies performed in 1991 in the same area, vector densities are significantly higher. A possible explanation for this is that the vectors (mainly *P. ariasi*) are moving towards higher altitudes perhaps because of global change. This increasing trend could have an impact on CanL and its geographical distribution.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) are vectors of canine leishmaniosis (CanL) caused by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, a widespread zoonotic disease that is endemic in the Mediterranean basin. *L. infantum* is transmitted to humans and animals by blood-sucking phlebotomine sand flies (Killick-Kendrick, 1990).

In the Madrid Autonomous region, leishmaniosis is the most common zoonotic disease that afflicts infants (aged 0–4 years) and also frequently affects patients with HIV infection (BECM, 2005). Only two sand fly species – *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 – out of the seven described in this region (Conesa Gallego, 1994), are proven vectors of the parasite, *P. perniciosus* being its main vector (Rioux et al., 1986;

Lucientes Curdi et al., 1988; Martín-Sánchez et al., 1994; Molina et al., 2005).

The first thorough descriptions of the distribution of sand flies in Spain were provided by Houin (1965) and Gil Collado et al. (1989). Since then, many descriptive surveys of sand fly distributions using sticky traps have been performed in the different regions of Spain: north east (Gállego et al., 1990; Benito De Martín et al., 1991; Lucientes Curdi et al., 1991), south east (Guevara et al., 1978; Morillas Márquez et al., 1983; Sanchís Marín et al., 1986; Martínez Ortega and Conesa Gallego, 1987; Goyena et al., 1991) and central region (Encinas Grandes et al., 1988; Conesa Gallego, 1994). All these surveys have revealed a sand fly status in Spain in which *Sergentomyia minuta* Rondani, 1843 is the most abundant species, followed by the two vector species of CanL: *P. perniciosus*, which is more widespread and less affected by climate conditions, and *P. ariasi*, which shows a preference for humid, cold areas (Aransay et al., 2004). Studies in the Granada and Zaragoza provinces have indicated that a minimum temperature of 17–18 °C is required for sand flies to remain active (Guevara et al., 1978; Lucientes et al., 2005).

* Corresponding author. Tel.: +34 91 8223674; fax: +34 91 5097034.
E-mail address: rmolina@isciii.es (R. Molina).

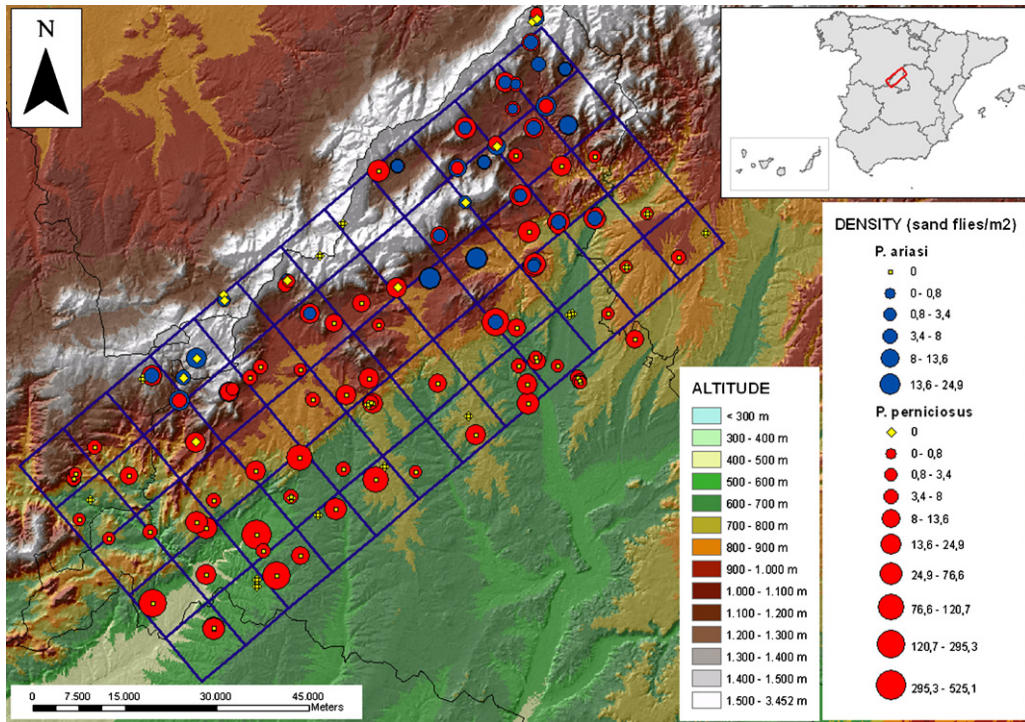


Fig. 1. Vector densities shown on a digital elevation model for the cross-sectional study.

The work presented here is one of several studies conducted in different Spanish regions under the Integrated Project of the European Commission entitled Emerging Diseases in a changing European eNvironment (EDEN). The aim of this project is to identify and catalogue European ecosystems and environmental conditions that determine the spatial and temporal distributions and dynamics of several pathogenic agents including *L. infantum* (EDEN-LEI).

The present survey conducted in Central Spain was designed to update sand fly abundance, diversity, spatial distribution and seasonal trend data with special attention paid to the habits of *P. perniciosus* and *P. ariasi*, as the vectors of *L. infantum* in Spain. The working hypothesis was that data on the environmental and meteorological factors affecting the density and distribution of both vectors could provide useful information on the spatial and temporal trends and, consequently, the risks of CanL infection.

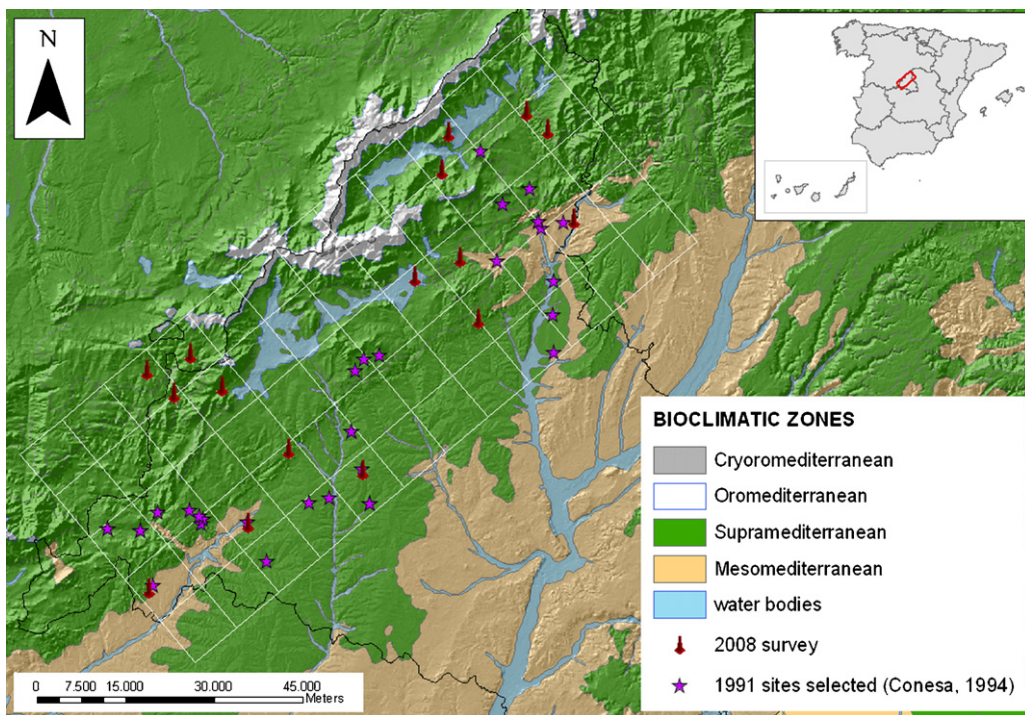


Fig. 2. Sand flies sites surveyed by study year and bioclimatic zone.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study was performed across a band of Central Spain (Fig. 1) spanning northeast to southwest including a mountain range (Sistema Central), foothills and plateau. The altitude of this region varies from 440 to 2414 m. Climate and vegetation are typically Mediterranean, with hot, dry summers and maximum rainfall recorded in autumn and spring. The area includes places such as Madrid (lying at 667 m), with a mean annual rainfall of 438 mm and temperature of 13.9 °C, along with Puerto de Navacerrada (at 1860 m), whose corresponding rainfall and temperature mean values are 1170 mm and 6.4 °C (Rivas-Martínez, 1983).

Four bioclimatic zones have been defined for the area: cryoro-, oro-, supra- and meso-Mediterranean (Rivas-Martínez, 1983), though the supra-Mediterranean region occupies 82.5% of the area (Fig. 2). This area was chosen because its widely varying altitude determines both broad climate and vegetation ranges, which could affect sand fly distributions. The area covers 5133.75 km² and is delimited by 4 fixed corners (La Torre de Esteban Hambrán, 40°10'N, 4°13'W; El Burguillo, 40°23'N, 4°29'W; Malaguilla, 40°49'N, 3°15'W; Somosierra, 41°07'N, 3°34'W).

2.2. Cross-sectional and seasonal studies

The cross-sectional study was conducted in 2006 and 2007, always during the month of July (except for 6 sites surveyed in September 2006). The sampling sites ($n = 123$) were evenly distributed across a 60-square grid (5 min ~ 9.25 km each side) and geocoded (Fig. 1). Adult sand flies were captured using sticky traps (A5-size paper coated with castor oil). At each sampling site, 10–20 sticky traps were set, making sure that every square contained at least one sampling site and 20 traps. Traps were left for four days and placed mainly inside the holes used to drain embankments or containment walls alongside roads, because they provide the microclimate required by sand flies for diurnal rest (Rioux et al., 1980, 1982).

To address seasonal trends in sand fly activity, 16 of the 123 sites were selected and sampled monthly from May to November of 2008 using the same procedure as in the cross-sectional survey. The 16 sites chosen were evenly distributed across the study area at different representative altitudes and in places proven to be good indicators of sand fly density in the cross-sectional study (Fig. 2).

2.3. Sand fly processing and identification

Collected sand flies were removed from sticky traps with the help of a brush, placed in 96% ethanol (to remove the oil) and then left in 70% ethanol until processing. Females were cleared in Mark André medium (Abonnenc, 1972) and mounted on glass slides in Hoyer medium (Upton, 1993). Sand flies were identified according to Gil Collado et al. (1989).

2.4. Data collection; assigning environmental and meteorological variables to sampling sites

A form was created using Pendragon Forms v.5.0 software (PSC, Libertyville, IL, USA). At each site, a handheld global positioning system (Tom Tom Wireless GPS MK II) was used to record the coordinates of the location. The data used to complete the form were related to: the quality control of traps (percentage of traps recovered in bad conditions: more or less than 33% of traps on the ground, unsticky, or wet with holes and/or snails), habitat (site and wall characteristics), nearby animals, microclimate (temperature and relative humidity measured inside hole) and macroclimate (mean

daily temperature and rainfall) (Table 1). Data from the handheld GPS were transferred to a PC database.

Daily temperature and rainfall data were provided by the Spanish Meteorological Agency (AEMet). Each sampling site was assigned data from the closest meteorological station using the spatial join-and-relate tool of ArcGis v.9.2 software (ESRI, Redlands, CA, USA). The distance of the site from the station was also included as a variable. Each site was assigned temperature and precipitation 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. Precipitation for the period sampling Day 1–Day 4 was introduced in the analysis as a dichotomous variable (presence/absence) since the survey was conducted in summer when there is usually scarce rainfall.

Using the Spatial Analyst application of the GIS software, corresponding altitude and vegetation data for each geocoded collection site were extracted from a 90 m resolution DEM (digital elevation model) and a vegetation layer.

2.5. Statistical analysis

Count response models were used to estimate the number of sand flies, but count data may also take the form of a rate. It was decided to estimate the abundance of the sand fly vector species (*P. perniciosus* and *P. ariasi*) as densities: number of sand flies per trap square metre. These models have the advantage that they provide exponentiated coefficients, which represent density ratios or incidence rate ratios. Relationships among sample characteristics, habitat, microclimate, macroclimate, vegetation, fauna and density were analyzed by negative binomial regression, a standard method used to model overdispersed count data (Hilbe, 2007).

All factors were subjected to bivariate analysis followed by backward stepwise selection in a multivariate model, starting with all variables showing a p -value lower than 0.2 in the bivariate analysis. Interactions between factors and covariates were evaluated in the final model. The likelihood ratio test was used to compare nested models and the Akaike information criterion (AIC) and Bayesian information criterion (BIC) were used to select the best model. Results are expressed as incidence rate ratios (IRR).

To describe changes produced over time in the study area, the data obtained in the 2008 longitudinal survey were compared with those reported for a longitudinal survey conducted also from May to November using the sticky trap method in the same region in 1991 (Conesa Gallego, 1994). The incidence rate ratio was calculated as a measure of change to compare vector density data. Vector densities were first compared unadjusted and then adjusted for the variables: sampling site altitude and orientation, vegetation, distance to nearest village (all extracted from a raster or feature layer), and mean monthly temperature and precipitation (from the nearest meteorological station).

The distributions of quantitative variables were described by their means and standard deviations or medians and interquartile ranges (IQR), or 25th to 75th percentiles. Categorical variables were expressed as percentages.

All statistical analyses were performed using Stata v.10.1 software (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). The level of significance was set at a p -value lower than 0.05.

3. Results

3.1. Descriptive analysis

3.1.1. Cross-sectional survey

Over the years 2006 and 2007, 1730 traps were set. Of these, 1673 were recovered (97%) from the 123 collection sites of the

Table 1Collection site characteristics and bivariate factors related to densities of *P. perniciosus* and *P. ariasi* for the cross-sectional study.

	N (%)	Bivariate IRR (95% CI)
Sampling site location		
Within a village	64 (52)	Ref
Between villages	20 (16)	7.81 (4.67–13.05) ^{***}
At village limits	39 (32)	1.82 (1.20–2.76) ^{**}
Sampling habitat		
Peri-urban	37 (30)	Ref
Rural	62 (50)	3.23 (1.82–5.74) ^{***}
Urban	24 (20)	0.67 (0.32–1.39)
Altitude, median (IQR), hm	8.61 (6.89–10.89)	0.8 (0.73–0.88) ^{***}
Type of roadway		
Unpaved track	44 (36)	Ref
Paved road	38 (31)	0.29 (0.15–0.55) ^{***}
Paved street	30 (24)	0.56 (0.29–1.09)
Other	11 (9)	2.42 (0.94–6.24)
Type of wall		
Embankment	41 (33)	Ref
Wall	60 (49)	0.83 (0.45–1.52)
Other	22 (18)	0.98 (0.44–2.15)
Wall aspect		
North-facing	30 (26)	Ref
East-facing	35 (31)	4.49 (2.70–7.48) ^{***}
South-facing	28 (25)	1.74 (1.02–2.99) [†]
West-facing	21 (18)	1.39 (0.77–2.50)
Site slope		
None	43 (36)	Ref
Shallow	53 (45)	0.62 (0.34–1.15)
Steep	22 (19)	0.6 (0.27–1.31)
Shelter		
Non sheltered	77 (64)	Ref
Sheltered	44 (36)	1.83 (1.05–3.21) [*]
Wall construction		
Brick	12 (10)	Ref
Other	13 (11)	1.21 (0.37–3.93)
Stone	98 (80)	0.65 (0.26–1.61)
Drain hole construction		
Brick	9 (7)	Ref
Cement	15 (12)	3.11 (0.91–10.67)
Other	18 (15)	1.69 (0.51–5.58)
Plastic	22 (18)	1.23 (0.38–3.9)
Unlined	59 (48)	1.11 (0.39–3.16)
Hole interior		
Dust	45 (39)	Ref
Dust/vegetation	8 (7)	0.6 (0.19–1.92)
Soil/vegetation	61 (54)	1.67 (0.93–3)
Refuse bin present		
No	87 (71)	Ref
Yes	36 (29)	0.91 (0.51–1.65)
Domestic dogs		
Not seen	68 (55)	Ref
Seen	55 (45)	1.43 (0.83–2.45)
Cats		
Not seen	110 (89)	Ref
Seen	13 (11)	0.69 (0.29–1.65)
Livestock (horses/cattle/sheep/pigs/goats)		
Not seen	102 (83)	Ref
Seen	21 (17)	3.55 (1.81–6.96) ^{***}
Birds (chickens/ducks/pigeons/other large birds)		
Not seen	120 (98)	Ref
Seen	3 (2)	2.02 (1.01–4.04) [*]
Vegetation		
Oak wood	29 (24)	Ref
Riverside	11 (9)	1.11 (0.54–2.29)
Holm-oak wood	80 (65)	2.64 (1.69–4.11) ^{***}
Other	3 (2)	1.45 (0.43–4.92)
Mean temperature (period 1), mean (SD), °C	22.8 (3)	0.88 (0.8–0.96) ^{**}

Table 1(Continued).

	N (%)	Bivariate IRR (95% CI)
Mean temperature (period 2), mean (SD), °C	21.3 (2.2)	0.77 (0.68–0.87)***
Mean temperature (period 3), mean (SD), °C	11.9 (1.4)	0.93 (0.74–1.16)
Rainfall presence (period 1)	28 (23)	0.81 (0.52–1.25)
Mean rainfall (period 2), mean (SD), mm	5 (5.3)	0.95 (0.9–1) [†]
Mean rainfall (period 3), mean (SD), mm	14.6 (5.8)	0.93 (0.88–0.97)**
Mean temperature measured in hole, mean (SD), °C	27.4 (3.7)	0.96 (0.89–1.05)
Mean humidity measured in hole, mean (SD), %	39.7 (15.1)	1.02 (1–1.03)

IRR, Incidence rate ratio; CI, confidence interval; hm, hectometre; Ref, Reference category; IQR, interquartile range; 25th percentile–75th percentile; SD, standard deviation; mm, millimetres; °C, degrees Celsius; period 1, sampling Day 1 (traps set) to Day 4 (traps recovered); period 2, the month before sampling; period 3, the year before sampling.

[†] $p < 0.05$.
^{**} $p < 0.01$.
^{***} $p < 0.001$.

study area. The quality control variables determined revealed that only at a few sites, more than 33% of the traps were recovered in bad conditions.

9557 sand flies of five species were captured and further identified as follows: 6839 specimens (71.6%) *S. minuta*, 2383 (24.9%) *P. perniciosus*, 248 (3%) *P. ariasi*, 76 (0.8%) *Phlebotomus sergenti* and 11 (0.1%) *Phlebotomus papatasi*. The sand fly sex ratio was significantly male-biased with the exception of *S. minuta* whose male/female proportions were similar. Despite *S. minuta* being the most abundant species, *P. perniciosus* showed the highest median density of 5.7 (1.6–9.2) sand flies per square metre. The value for *S. minuta* was 1.1 (0–28.4). Moreover, *P. perniciosus* was detected in 95 of the 123 collecting sites surveyed (77%) while *S. minuta* appeared in 70 (57%). *P. ariasi*, the third most abundant species and a possible vector for the leishmaniosis parasite, was detected at 38 of the sites (31%). Vector densities are shown in Fig. 1.

Table 1 shows the environmental and meteorological variables determined at each sampling site. Traps were set more frequently within settlements 64 (52%) and in a rural habitat 62 (50%). The altitudes of the villages included in the study varied from 463 to 1841 m above sea level (median 861 m; IQR 689–1089 m). Sampling was homogeneous in terms of site location and wall orientation. The fauna observed near the sampling sites were dogs at 55 sites, cats at 13, livestock at 21, and birds (domestic or not) at 3 sites. The most frequent vegetation was holm-oak wood at 80 sites (65%) followed by oak wood at 29 (24%). The temperature average for the four sampling days was 22.8 °C. The presence of rainfall was recorded at 28 sites (23%) during these four sampling days. Average temperature and relative humidity measured in the holes where the traps were set were 27.4 °C and 39.7% respectively.

3.1.2. Seasonal survey

In 2008, 1961 traps were set at 16 selected sites and surveyed monthly from May to November; of these 1873 were recovered. At few sites were more than 33% of traps recovered in bad conditions.

14,353 sand flies of five species were captured and further identified as follows: 9537 specimens (66.45%) *S. minuta*, 4587 (31.96%) *P. perniciosus*, 213 (1.48%) *P. ariasi*, 14 (0.10%) *P. sergenti* and 2 (0.01%) *P. papatasi*. The seasonal trends shown by both vector species are illustrated in Fig. 3. *P. perniciosus* showed a diphasic seasonal abundance trend from May to November whereas *P. ariasi* displayed a monophasic trend from May to October.

3.1.3. Changes over time

To describe changes in sand fly distributions in the study area produced over time, we compared the data obtained here in the 2008 longitudinal survey to those of a survey conducted in 1991 in the Madrid region (Conesa Gallego, 1994). Cumulative vector densities for the period May to November for 33 historical sites in the present study area were compared with the densities recorded over the same period for the current 16 sites (Fig. 2). The unadjusted density ratio indicated a significant increase in the density of *P. ariasi*, 16.02 [95% CI (4.11–62.46)] ($p < 0.001$) compared to the value for 1991. After adjusting for the significant confounding variables, altitude, orientation and vegetation, IRR = 6.23 [95% CI (1.19–32.6)] ($p < 0.05$), the density ratio was still significantly higher. In addition, when it was adjusted for the variables that appeared in the multivariate analysis conducted in the cross-sectional study, i.e., altitude, orientation, mean precipitation, mean temperature, vegetation and distance to nearest village, it was obtained a significant increase in the density of *P. ariasi*, IRR = 8.1 [95% CI (1.14–57.75)] ($p < 0.05$). The

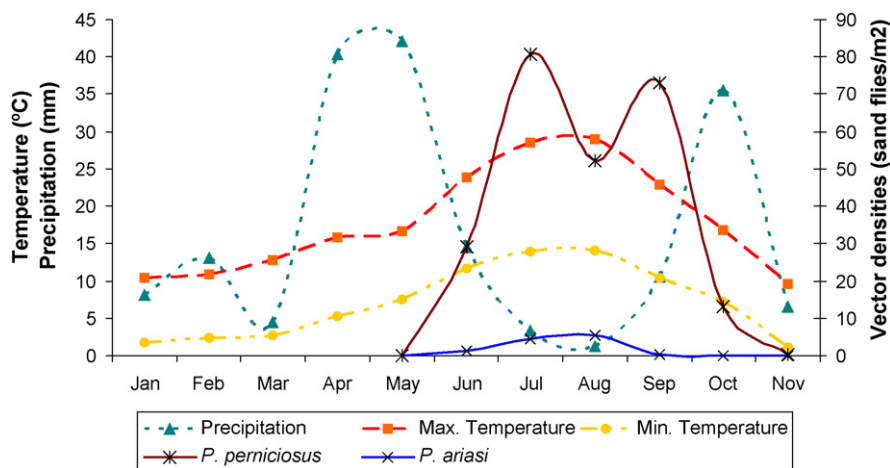


Fig. 3. Seasonal trends in vector densities and meteorological variables.

unadjusted IRR was not significant when the density of *P. perniciosus* was compared to that recorded in the 1991 survey, IRR = 2 [95% CI (0.87–4.64)] ($p > 0.05$). However, after adjusting for altitude, orientation and mean precipitation or for altitude, orientation, mean precipitation, mean temperature, vegetation and distance to nearest village, both IRRs were statistically significant, IRR = 2.47 [95% CI (1.09–5.6)] ($p < 0.05$) or IRR = 2.55 [95% CI (1.04–6.31)] ($p < 0.05$) respectively.

3.2. Bivariate analysis

The results of the bivariate analysis of factors associated with vector densities (*P. perniciosus* and *P. ariasi*) appear in Table 1. Densities recorded between villages (IRR = 7.81 [95% CI (4.67–13.05)]) ($p < 0.001$) and at the limits of villages (IRR = 1.82 [95% CI (1.20–2.76)]) ($p < 0.01$) were significantly higher than those observed within the villages. Sand fly densities in the rural areas were significantly higher ($p < 0.001$) (IRR = 3.23 [95% CI (1.82–5.74)]) than those observed in peri-urban and urban areas. Altitude (measured in hectometres) was significantly linked to vector density ($p < 0.001$) with an IRR of 0.8 [95% CI (0.73–0.88)], meaning that for each hectometre increase in altitude, vector density dropped by 20%. The sampling sites with a paved road rendered significantly lower densities ($p < 0.001$) (IRR = 0.29 [95% CI (0.15–0.55)]) than the rest of the categories. Sites facing east and south were significantly higher with IRR = 4.49 [95% CI (2.70–7.48)] ($p < 0.001$) or IRR = 1.74 [95% CI (1.02–2.99)] ($p < 0.05$) respectively. Sites sheltered from wind showed significantly higher densities, and the presence of livestock or birds was also linked to a significantly higher vector density, with an IRR = 3.55 [95% CI (1.81–6.96)] ($p < 0.001$) or IRR = 2.02 [95% CI (1.01–4.04)] ($p < 0.05$) respectively. Vector densities were significantly higher in the holm-oak woods ($p < 0.001$) (IRR = 2.64 [95% CI (1.69–4.11)]). Vector densities also varied significantly according to the mean temperatures recorded for the four sampling days 0.88 [95% CI (0.8–0.96)] ($p < 0.01$) or the previous month 0.77 [95% CI (0.68–0.87)] ($p < 0.001$); thus for each degree Celsius rise in temperature, vector densities fell by 22% or 33% respectively. In addition, significant correlations were observed between sand fly densities and the mean rainfall recorded for the month before sampling, 0.95 [95% CI (0.9–1)] ($p < 0.05$) or the year before sampling, 0.93 [95% CI (0.88–0.97)] ($p < 0.001$) such that densities dropped by 5% or 7% respectively for each millimetre increase in rainfall.

3.3. Multivariate analysis

The final model revealed that sampling site location, mean temperature during the four sampling days, wall aspect, vegetation type and altitude showed an effect on vector densities (Table 2). Mean temperature over the four sampling days, altitude and holm-oak wood were negatively correlated with vector density. However, a location between villages or at the limits of a village and an east/south facing site was positively correlated with vector density.

4. Discussion

Five sand fly species were detected in the study area, as reported in 1984 by Fraile González (1984). The cross-sectional survey conducted in 2006 and 2007 identified *S. minuta* as the most abundant sand fly species, followed by the two proven vectors of *L. infantum*: *P. perniciosus* and *P. ariasi*. The number of *P. sergenti* and *P. papatasi* specimens observed was insufficient to draw any valid conclusions. In a survey undertaken in 1991, Conesa Gallego (1994) also identified *S. minuta* as the most abundant species in Madrid (50.8%) followed by *P. perniciosus* (44.8%), whereas *P. ariasi* appeared in very low numbers (0.7%) even fewer than *P. papatasi* (2.6%) and

Table 2

Multivariate factors associated with densities of *P. perniciosus* and *P. ariasi* for the cross-sectional study.

	Multivariate IRR (95% CI)
Traps still sticky	
No	Ref
Yes	4.82 (2.23–10.41)***
Sampling site location	
Within a village	Ref
Between villages	3.69 (1.95–7.01)***
At village limits	1.57 (0.99–2.50)
Mean temperature (over the 4 sampling days)	0.93 (0.87–1)*
Wall aspect	
North-facing	Ref
East-facing	2.93 (1.65–5.22)***
South-facing	1.98 (1.08–3.64)*
West-facing	1.23 (0.61–2.49)
Vegetation	
Oak wood	Ref
Irrigated lands	0.71 (0.31–1.61)
Holm-oak wood	0.53 (0.27–1.04)
Other	0.56 (0.12–2.64)
Altitude in hm	0.83 (0.74–0.92)***

IRR, Incidence rate ratio; CI, confidence interval; hm, hectometres, Ref, reference category.

* $p < 0.05$.

*** $p < 0.001$.

P. sergenti (1%). In the present survey (2006–2007), *P. perniciosus* showed the highest median density, at 5.7 sand flies per square metre versus 1.1 for *S. minuta*, and a wider distribution than the remaining species, appearing at 77% of the sampling sites. Conesa Gallego (1994) also found *P. perniciosus* to be the most frequent species (82.7%). *P. perniciosus* and/or *P. ariasi* were detected at 83% of the sampling sites, accounting for the endemicity of CanL in this area (Amela et al., 1995; Miró et al., 2007; Gálvez et al., 2009). The sand fly sex ratio was significantly male-biased in genus *Phlebotomus*, probably because embankment drainage holes are only used as resting sites. Accordingly, the similar sex ratio observed for *S. minuta* can be explained by the fact that this species rests and feeds in the same holes where cold-blooded vertebrates live. Owing to its ecological plasticity, *P. perniciosus* showed a wide distribution spanning the entire altitude range in which sand flies were found (from 463 to 1548 m), including the two main bioclimatic zones. *P. ariasi* is much more fastidious and prefers a cooler more humid climate, such that this species was detected at sites in the altitude range 689–1548 m, and mainly in mountainous areas in the supra-Mediterranean zone. Other authors have also reported that *P. ariasi* generally thrives in humid, cold high-mountain areas (Rioux et al., 1986; Rispail et al., 2002). Only 2 out of the 38 sites at which *P. ariasi* was observed occur in the meso-Mediterranean bioclimatic zone. In a survey performed in Spain from the Ebro river valley to Valencia, *P. ariasi* appeared at altitudes above 750 m and predominated over *P. perniciosus* in the cooler, more humid supra-Mediterranean bioclimatic belt (Aransay et al., 2004). The possible roles of both *P. perniciosus* and *P. ariasi* in the CanL life cycle at higher altitudes in Madrid region must be considered.

Knowledge of specific environmental requirements is essential to understand vectorial capacities. It was explored the influence of environmental variables on vector densities. Thus, higher vector densities were found in the areas between villages, in rural habitats and unpaved areas. The type of wall, the slope of the site surveyed, the wall construction or contents of the hole were unimportant, yet significantly higher vector densities were detected at sites sheltered from the wind. This preference for more natural, protected sites suggests the parasite vector prefers undisturbed habitats. Higher vector densities were recorded in east and south-facing

survey sites since these sites receive less hours of sunshine and provide the ideal humidity and temperature conditions required for resting. In Irak, traps placed at sites facing north-east generally collected more sand flies (Coleman et al., 2007). Nearby livestock and birds (chicken included) led to an increase in vector densities. In southwestern Morocco, *P. perniciosus* constitutes a large portion of the microfauna of cattle sheds (Guernaoui and Boumezzough, 2009). The authors of this last study suggest that *P. perniciosus* sets up its breeding sites near cattle sheds, since they collected a great number of newly emerged males close to cow dung. A similar conclusion was reached in a study conducted in Colombia, where newly emerged *Lutzomyia longipalpis* were detected near pigpens (Ferro et al., 1997). According to the authors of a survey performed in Syria, a likely reason for the higher density of *P. papatasi* noted in Khan Toman village was the presence of cattle (Maroli et al., 2009). Further, chickens kept near homes could promote *L. infantum* transmission as suggested in Brazil for *L. longipalpis* (Alexander et al., 2002). Conversely, it was found that the presence of dogs (as the main host of *L. infantum*) or cats was not linked to greater vector densities. Altitude was observed to correlate negatively with vector densities. As altitude increases, vegetation changes, temperature decreases (according to the thermal gradient at a rate of -0.6°C per 100 m) and precipitation increases (Rivas-Martínez, 1983). Thus, an increased altitude will provide a more hostile environment for sand fly survival. Some authors have accordingly indicated that altitude shows negative correlation with sand fly abundances (Elnaiem et al., 1998; Ferreira et al., 2001; Gebre-Michael et al., 2004). In Sudan, it has been determined through map modelling that average rainfall and altitude are the best predictors of the incidence of leishmaniasis (Elnaiem et al., 2003). In the bivariate analysis, holm-oak wood emerged as the most appropriate vegetation type for the vectors and oak wood as the least suitable, whereas the opposite was true in the multivariate analysis. This contradiction could be explained by the fact that the factor altitude encompasses the effects of many others like vegetation. Thus, altitude behaved as a confounding factor between vegetation and vector densities in the multivariate analysis. Measures of microclimatic variables do not seem to affect vector density. However, the macroclimate temperature and rainfall means recorded at the closest meteorological stations correlated negatively with vector densities. Temperature determines sand fly survival as well as the speed of development of the different stages of its life cycle (Elnaiem et al., 1998; Killick-Kendrick, 1999; Gage et al., 2008). When extreme temperatures were recorded during the survey days or the month prior to sampling, vector activity and thus vector captures were limited. According to El-Badry et al. (2008), both sand fly adults and larvae are sensitive to high temperatures and low humidity. Precipitation determines sand fly survival and promotes adult emergence and appropriate oviposition sites (Gage et al., 2008). In the present study, mean precipitation values for the previous month and year were negatively correlated with vector densities. Some authors have correlated precipitation with sand fly abundance (Ghosh et al., 1999; Salomon et al., 2004) except in extreme high-rainfall conditions (Ghosh et al., 1999; Rossi et al., 2008).

The length of the activity period and sand fly densities are largely regulated by the climate conditions that affect their life cycle (Morillas Márquez et al., 1983; Benito De Martín et al., 1991; Lucientes Curdi et al., 1991). Here, *P. perniciosus* displayed a bimodal annual abundance pattern with two peaks observed in July and in September as reported previously for Spain (Morillas Márquez et al., 1983; Sanchís Marín et al., 1986; Lucientes Curdi et al., 1991). This species is the main vector of leishmaniasis in Spain because of its longer seasonal activity period and because it shows a higher density than *P. ariasi* (Morillas Márquez et al., 1983; Encinas Grandes et al., 1988; Lucientes Curdi et al., 1991). In contrast, *P. ariasi* only showed one peak in August as reported for Central Spain

(Encinas Grandes et al., 1988). Laboratory observations suggest that the apparent single peak is the result of overlapping generations (Ready and Croset, 1980). Here, maximum vector densities were observed between the two rainfall peaks produced in spring and autumn.

Compared to a survey conducted 17 years earlier (Conesa Gallego, 1994), the findings of this study reveal the absence of two species (*P. longicuspis* and *P. langeroni*) along with higher sand fly densities in 2008 than in 1991. Unadjusted proportion ratios also indicate a significant rise over the years in *P. ariasi* and by adjusting for selected variables we were able to confirm the significant increases produced in the densities of both vectors *P. ariasi* and *P. perniciosus*. These results should nevertheless be interpreted with caution, first because of the small sample sizes compared, and second because monthly data were summarized. The increased vector densities observed in the same bioclimatic zone (supra-Mediterranean) 17 years later could be attributable to the fact that the vector species, mainly *P. ariasi*, seems to be moving towards higher altitudes perhaps because of global change (Ready, 2008). However changing environmental factors are poorly understood and cautious analysis of data should be done. Leishmaniasis has suffered a northward spread in continental Italy and comparing with historical studies Maroli et al. (2008) have also confirmed increased vector densities (*P. perniciosus* and *P. neglectus*).

According to a survey conducted 15 years ago, the Madrid region has seen a significant increase in the seroprevalence of CanL (Gálvez et al., 2009). Since sand fly densities go hand in hand with host infection prevalences, vector density could be used as an indicator of the risk of CanL in a given area (Alam et al., 2009; Chelbi et al., 2009; Martín-Sánchez et al., 2009). In effect, a slight increase in the incidence of CanL in Italy and the spread of *P. perniciosus* into Switzerland have been predicted using a multivariate model in which temperature parameters were varied to simulate global warming (Kuhn, 1999).

Careful monitoring of meteorological and environmental variables related to vector biology allows for the design of effective strategies to prevent CanL infection. Knowledge of spatial and seasonal trends will help decide both where and when to implement control programmes.

Acknowledgements

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III and the EU FP6 project "EDEN" (GOCE-2003-010284), Subproject EDEN-LEI, and is catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN 0186 (www.eden-fp6project.net). The contents are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. The authors thank Paul Ready and Jon Cox for advising in the design of the study and providing databases. The Spanish Meteorological Agency (AEMet) provided meteorological data. Jorge Barón helped with the design of the figures and Irene Mata collaborated in the field work.

References

- Abonnenc, E., 1972. Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). In: Mémoires ORSTOM, Paris, p. 289.
- Alam, M.S., Wagatsuma, Y., Mondal, D., Khanum, H., Haque, R., 2009. Relationship between sand fly fauna and kala-azar endemicity in Bangladesh. Acta Trop. 112, 23–25.
- Alexander, B., de Carvalho, R.L., McCallum, H., Pereira, M.H., 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg. Infect. Dis. 8, 1480–1485.
- Amela, C., Méndez, I., Torcal, J.M., Medina, G., Pachón, I., Cañavate, C., Alvar, J., 1995. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. Eur. J. Epidemiol. 11, 157–161.
- Aransay, A.M., Testa, J.M., Morillas-Márquez, F., Lucientes, J., Ready, P.D., 2004. Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. Parasitol. Res. 94, 416–420.

- BECM, 2005. Zoonosis. Comunidad de Madrid, años 2002–2004. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid 11, pp. 47–77.
- Benito De Martín, M.I., Lucientes Curdi, J., Orcajo Teresa, J., Castillo Hernández, J.A., 1991. Seasonal dynamics of *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) populations in Aragon (N.E. Spain). *Parassitologia* 33 (Suppl.), 89–97.
- Chelbi, I., Kaabi, B., Bejaoui, M., Derbali, M., Zhioua, E., 2009. Spatial correlation between *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae) and incidence of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *J. Med. Entomol.* 46, 400–402.
- Coleman, R.E., Burkett, D.A., Sherwood, V., Caci, J., Spradling, S., Jennings, B.T., Rowton, E., Gilmore, W., Blount, K., White, C.E., Putnam, J.L., 2007. Impact of phlebotomine sand flies on U.S. Military operations at Tallil Air Base, Iraq. 2. Temporal and geographic distribution of sand flies. *J. Med. Entomol.* 44, 29–41.
- Conesa Gallego, E., 1994. Los flebotomos (Diptera: Psychodidae) de la Comunidad de Madrid. Implicaciones Epidemiológicas. Universidad de Murcia, 381 pp.
- El-Badry, A., Al-Juhani, A., Ibrahim el, K., Al-Zubiani, S., 2008. Distribution of sand flies in Al-Nekheil province, in Al-Madinah Al-Munawwarah region, western of Saudi Arabia. *Parasitol. Res.* 103, 151–156.
- Elnaiem, D.A., Connor, S.J., Thomson, M.C., Hassan, M.M., Hassan, H.K., Aboud, M.A., Ashford, R.W., 1998. Environmental determinants of the distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 877–887.
- Elnaiem, D.E., Schorscher, J., Bendall, A., Obsomer, V., Osman, M.E., Mekki, A.M., Connor, S.J., Ashford, R.W., Thomson, M.C., 2003. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 10–17.
- Encinas Grandes, A., Gómez-Bautista, M., Martín Novo, M., Simón Martín, F., 1988. Leishmaniasis in the province of Salamanca, Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 63, 387–397.
- Ferreira, A.L., Sessa, P.A., Varejao, J.B., Falquetto, A., 2001. 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* 96, 1061–1067.
- Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., Morrison, A.C., 1997. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J. Med. Entomol.* 34, 719–728.
- Frailé González, R., 1984. Flebotominae de la Region Central. Universidad Complutense de Farmacia, Madrid.
- Gage, K.L., Burkot, T.R., Eisen, R.J., Hayes, E.B., 2008. Climate and vectorborne diseases. *Am. J. Prev. Med.* 35, 436–450.
- 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. Iber. Parasitol.* 50, 123–127.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E., Molina, R., 2009. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (Central Spain). *Vet. Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2009.11.025.
- Gebre-Michael, T., Malone, J.B., Balkew, M., Ali, A., Berhe, N., Hailu, A., Herzi, A.A., 2004. Mapping the potential distribution of *Phlebotomus martini* and *P. orientalis* (Diptera: Psychodidae), vectors of kala-azar in East Africa by use of geographic information systems. *Acta Trop.* 90, 73–86.
- Ghosh, K., Mukhopadhyay, J., Desai, M.M., Senroy, S., Bhattacharya, A., 1999. Population ecology of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) in West Bengal, India. *J. Med. Entomol.* 36, 588–594.
- Gil Collado, J., Morillas Márquez, F., Sanchís Marín, M.C., 1989. Los flebotomos en España. *Rev. Sanid. Hig. Publica (Madr.)* 63, 15–34.
- Goyena, M., Conesa Gallego, E., Romera, H., Martínez-Ortega, E., 1991. Estudio biométrico de las poblaciones de *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) del Sureste de la Península Ibérica. *Parassitologia* 33 (Suppl.), 273–281.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., 2009. Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco. *J. Med. Entomol.* 46, 1187–1194.
- Guevara, P., Ubeda-Ontiveros, J.M., Morillas-Márquez, F., 1978. Phlebotominae de la provincia de Granada: Estudio de Poblaciones. *Rev. Iber. Parasitol.* 38, 813–839.
- Hilbe, J.M., 2007. Negative Binomial Regression. Cambridge University Press, NY, p. 264.
- Houin, R., 1965. Nouvelles localisations de phlébotomes en Espagne. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 40, 341–363.
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4, 1–24.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289.
- Kuhn, K.G., 1999. Global warming and leishmaniasis in Italy. *Trop. Med. Int. Health* 7, 1–2.
- Lucientes Curdi, J., Sánchez Acedo, C., Castillo Hernández, J.A., Estrada Peña, A., 1988. Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniasis de Zaragoza. *Rev. Iber. Parasitol.* 48, 7–8.
- Lucientes Curdi, J., Benito de Martín, M.I., Castillo Hernández, J.A., Orcajo Teresa, J., 1991. Seasonal dynamics of *Larrousius* species in Aragon (N.E. Spain). *Parassitologia* 33 (Suppl.), 381–386.
- Lucientes, J., Palmero, J., Guarga, J.L., Gracia, M.J., Peribanez, M.A., Zarate, J., Castillo, J.A., 2005. Risk of transmission of canine leishmaniasis in eastern Spain. *Vet. Rec.* 156, 743–744.
- 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.
- Maroli, M., Jalouk, L., Al Ahmed, M., Bianchi, R., Bongiorno, G., Khoury, C., Gradoni, L., 2009. Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria. *Med. Vet. Entomol.* 23, 148–154.
- Martínez Ortega, E., Conesa Gallego, E., 1987. Fenología de los flebotomos del subgénero *Larrousius* (Dip. Psychodidae, Phlebotomus) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín Asoc. Esp. Entom.* 11, 293–300.
- Martín-Sánchez, J., Guilvard, E., Acedo-Sánchez, C., Wolf-Echeverri, M., Sanchís-Marín, M.C., Morillas-Márquez, F., 1994. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 24, 405–408.
- 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.
- Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., Caballero, M.J., Molina, R., 2007. A leishmaniasis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitol. Res.* 101, 253–257.
- Molina, R., Aransay, A., Nieto, J., Cañavate, C., Chicharro, C., Sans, A., Flores, M., Cruz, I., García, E., Alvar, J., 2005. The phlebotomine sand flies of Ibiza and Formentera islands (Spain). Fifth International Symposium on Phlebotomine Sandflies (ISOPS 5), Tunisia, April 2005. *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 82, 12.
- Morillas Márquez, F., Guevara Benitez, D.C., Ubeda Ontiveros, J.M., González Castro, J., 1983. Fluctuations Annuelles Des Populations de Phlebotomes (Diptera, Phlebotomidae) Dans la Province de Grenade (Espagne). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58, 625–632.
- Ready, P.D., 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev. Sci. Tech.* 27, 399–412.
- Ready, P.D., Croset, H., 1980. Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera: Psychodidae) from southern France. *Bull. Entomol. Res.* 70, 511–523.
- Rioux, J.A., Killick-Kendrick, R., Perieres, J., Turner, D.P., Lanotte, G., 1980. Ecologie des Leishmanioses dans le Sud de la France. Les sites de "flanc de coteau", biotopes de transmission privilégiés de la Leishmaniose viscérale en Cévennes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 55, 445–453.
- Rioux, J.A., Perieres, J., Killick-Kendrick, R., Lanotte, G., Bailly, M., 1982. Ecologie des Leishmanioses dans le Sud de la France, 17. Échantillonnage des Phlébotomes par le procédé des pièges adhésifs. Comparaison avec la technique de capture sur appât humain. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57, 631–635.
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Gallego, J., Moreno, G., Pralong, F., Portús, M., Rispaill, P., Gallego, M., Bastien, P., 1986. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer: Infestations par deux zymodemes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). In: IMEEE (Ed.), *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Éco-Épidémiologiques*. Montpellier, pp. 439–444.
- Rispaill, P., Dereure, J., Jarry, D., 2002. Risk zones of human Leishmaniasis in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 477–483.
- Rivas-Martínez, S., 1983. Pisos bioclimáticos de España. *Lazaroa* 5, 33–43.
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2008. 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.* 105, 158–165.
- Salomon, O.D., Wilson, M.L., Munstermann, L.E., Travi, B.L., 2004. Spatial and temporal patterns of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in northern Argentina. *J. Med. Entomol.* 41, 33–39.
- Sanchís Marín, M.C., Morillas-Márquez, F., González-Castro, J., Benavides-Delgado, I., Reyes Magaña, A., 1986. Dinámica estacional de los flebotomos (Diptera: Psychodidae) de la provincia de Almería (España). *Rev. Iber. Parasitol.* 46, 285–291.
- Upton, M.S., 1993. Aqueous gum-chloral slide mounting media: an historical review. *Bull. Entomol. Res.* 83, 267–274.

CAPÍTULO 3

Mapping current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector based on environmental variables and expected climate change in the Madrid region (Spain)

Mapping current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector based on environmental variables and expected climate change in the Madrid region (Spain)

(Under review - Vector Borne and Zoonotic Diseases)

Rosa Gálvez ¹, Miguel A. Descalzo ², Irene Guerrero ³, Guadalupe Miró ⁴, Ricardo Molina ^{1,*}

¹ Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Crtra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

² Unidad de Investigación, Sociedad Española de Reumatología, C/Marqués del Duero 5, 28001 Madrid, Spain

³ Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, C/Darwin 2, 28049 Madrid, Spain

⁴ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

ABSTRACT

Leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* is a widespread zoonotic disease endemic in the Mediterranean basin. Based on point abundance data from a previous entomological survey for the two sand fly vectors of leishmaniosis in the Madrid region (*Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi*), models were constructed to predict spatial distribution patterns of the vectors. The models were obtained by negative binomial regression of several environmental variables and then mapped. To validate the maps, we used serological prevalence data of *Leishmania* infection in dogs and incidence data obtained through questionnaires completed by veterinarians in the region. It was observed that seropositive dogs and veterinary clinics registering a higher incidence of canine leishmaniosis (CanL) appeared closer to our modelled vector foci. In the face of climate change, we also simulated the future distributions of the sand flies for each third of the twenty first century and predict their spread in the region.

Keywords: *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus ariasi*, *Leishmania infantum*, climate change, GIS, spatial analysis.

Running Title: Mapping sand fly vector in Madrid

*Corresponding author. Tel.: +34 91 8223674; fax: +34 91 5097034. E-mail address: rmolina@isciii.es (Ricardo Molina)

INTRODUCTION

Leishmaniosis is a widespread endemic disease in the Mediterranean basin transmitted to humans and animals by blood-sucking phlebotomine sand flies (Killick-Kendrick, 1990). In the Madrid region, it is the most common zoonotic disease that afflicts infants (aged 0–4 years) and also frequently affects patients with HIV infection (BECM, 2005). *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi* are the proven vectors of *Leishmania infantum* in Spain (Rioux, 1986; Lucientes Curdi, 1988; Martín-Sánchez et al., 1994), *P. perniciosus* being its main vector in the Madrid region (Conesa Gallego, 1997; Gálvez et al., 2010b).

Interest in this disease has been rekindled by a proposed, yet disputed, risk of reintroduction of leishmaniosis in Europe (Dujardin et al., 2008; Ready, 2010) fuelled by the idea that climate and environmental factors determine the current geographical distribution range of its vectors. However, this zoonosis (Chargui et

al., 2007; Antoniou et al., 2009; Martín-Sánchez et al., 2009; Gálvez et al., 2010a; Mazeris et al., 2010) and its vectors (Maroli et al., 2008; Gálvez et al., 2010b) have proved particularly challenging in terms of predicting their trends, and it is thought that new tools such remote sensing and geographic information systems (GIS) could help predict the spread of leishmaniosis according to changing human activities and environmental conditions (Ready, 2008). Mapping disease occurrence based on explanatory variables, or predicting its future distribution based on expected climate changes, could serve to identify potential risk areas for human infection both in space and time (Kitron, 1998; Kitron, 2000).

The first studies to apply these tools in leishmaniosis vector epidemiology emerged in the late 1990s. A model of *Phlebotomus papatasi* distribution was developed in Southwest Asia based on weather and a so-called normalized difference vegetation index (NDVI) (Cross et al., 1996). A 1–5°C rise in ambient temperature has been linked to the expansion *P. papatasi* in southwest

Asia (Cross and Hyams, 1996). Also, through a logistic regression approach, a risk map was created for the presence of *Phlebotomus orientalis* in Sudan based on soil type, mean annual daily maximum temperature and rainfall (Thomson et al., 1999).

More recently, several leishmaniosis risk maps based on environmental factors have been developed (Elnaiem et al., 2003; Gebre-Michael et al., 2004; King et al., 2004; Chamaille et al., 2010) and vector-reservoir distribution forecasts have been made under the premise of pending climate change (Peterson and Shaw, 2003; González et al., 2010).

The objectives of this study were to construct vector distribution maps based on environmental variables and then to project these distributions to future climate scenarios for each third of the 21st century. These maps will provide useful information on the ecology of the leishmaniosis sand fly vectors in the Madrid region on which to base the design of appropriate and focused control measures.

MATERIALS AND METHODS

Study site

The study was conducted under the EDEN project (www.eden-fp6project.net), whose aim is to identify and catalogue European ecosystems and environmental conditions that determine the spatial and temporal distributions and dynamics of several pathogenic agents, including *L. infantum*. The study area was the Madrid province (Fig. 1), central Spain (40°22'N and 3°43'W). The altitude of this region varies from 491–883 m in the south and centre, to 767–2400 m in its northern area. Climate and vegetation are typically Mediterranean, with hot, dry summers and maximum rainfall recorded in autumn and spring.

Entomological records

A cross-sectional survey was conducted in July 2006 and 2007 across a band spanning northeast to southeast of the Madrid region, where canine leishmaniosis (CanL) is endemic (Amela et al., 1995; Miró et al., 2007; Gálvez et al., 2010a). The area selected included a mountain

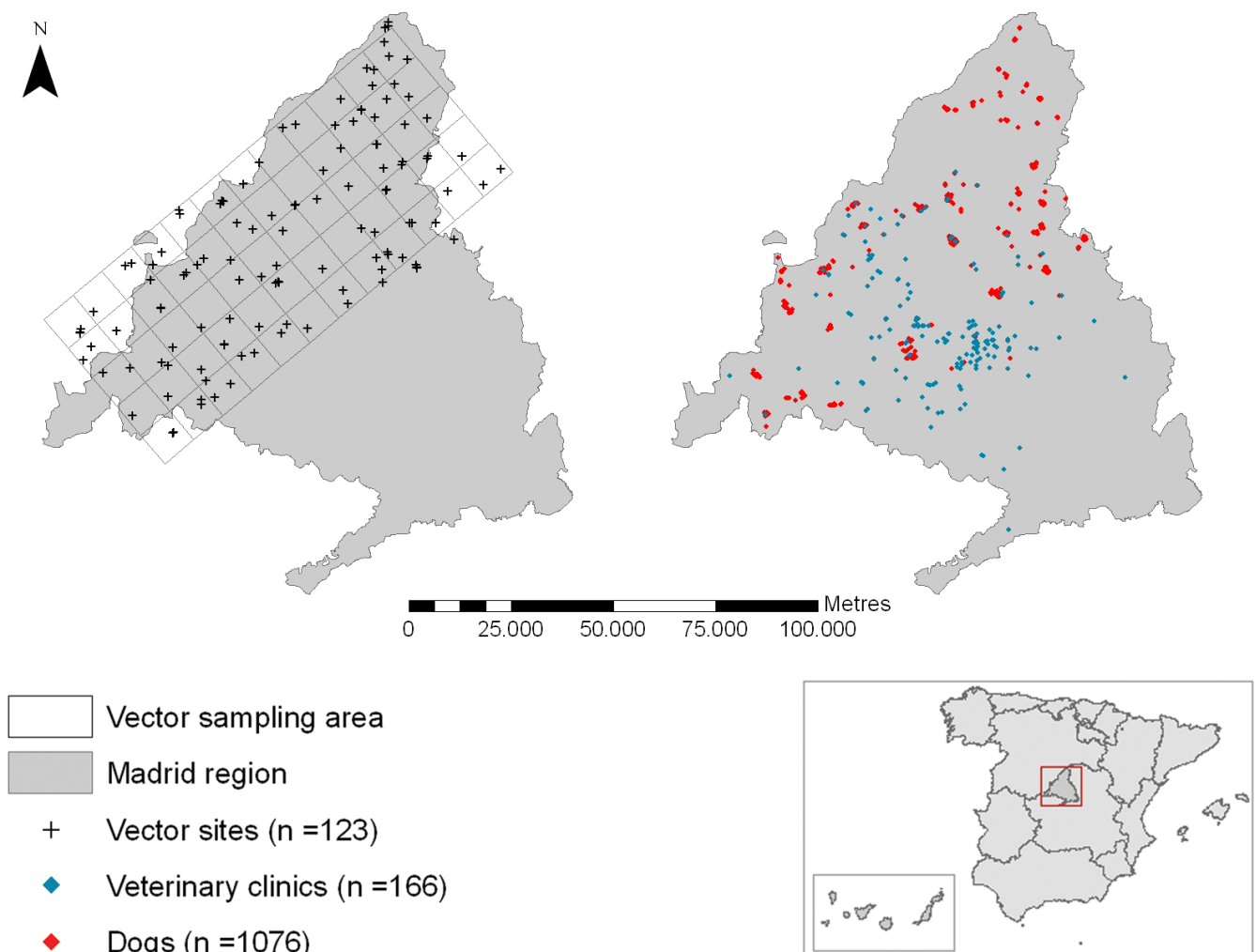


Fig. 1. Geocoded locations of dogs, vectors and veterinary clinics.

range (Sistema Central), and its foothills and plateau region. The widely-varying altitude (440 to 2414 m) of the study area determines both broad climate and vegetation ranges, influencing sand fly distributions. A description of this survey has been published elsewhere (Gálvez et al., 2010b). In brief, 123 sampling sites were set up evenly distributed across a 60-square grid (5 min each side) in the study area, and geocoded using a GPS (see Fig. 1). Ten to twenty sticky traps (A5-size paper coated with castor oil) were set for four days at each sampling site. The traps were mainly placed inside the holes used to drain embankments or containment walls alongside roads. These sites provide the microclimate required by sand flies for diurnal rest (Rioux et al., 1982). The data used for model constructions were the densities of *P. perniciosus* and *P. ariasi* calculated as the number of sand flies per trap square metre recovered from the 123 sampling sites.

Environmental and meteorological variables

Using GIS software ArcGis v.9.2 (ESRI, Redlands, CA, USA), each sampling site was assigned a set of meteorological and environmental variables including: mean rainfall recorded over the four seasons of a year; minimum, maximum and mean temperatures for the four seasons; altitude; aspect; land cover; distance to urban settlement; distance to nearest livestock farm (cows, goats, pigs, horses and sheeps) and distance to nearest poultry farm (quails, pheasants, chickens, geese, pigeons, ducks, turkeys, partridges, guinea fowls or ratites).

Daily temperature and precipitation data were provided by the Spanish Meteorological Agency (AEMet). Each sampling site was assigned data from the closest meteorological station in the study area (n=155) using the spatial join-and-relate tool of the GIS software. Temperature and precipitation values were those recorded from September to November, December to February, and March to May of the year before the sampling date, and during the summer (June to August) when the field work was conducted. Using the Spatial Analyst application (SAA) of the GIS software, we then extracted corresponding values for the topographical variables (altitude and aspect) from a 90 m resolution digital elevation model (DEM). A 300 m resolution land cover layer based on MERIS satellite imagery from January 2005 to June 2006 provided by the European space agency (ESA) was used to define the following land use categories: cultivated areas, forest and shrubland, sparse vegetation, urban areas and water bodies. Through SAA, land cover values for each sampling site were obtained by: (a) corresponding land cover extractions (model 1); or (b) percentages of land cover categories in a 250 m and 500 m buffer zone around each sampling site (model 2), a distance equivalent to estimated reach of sand fly flight (Rioux et al., 1979; Killick-Kendrick

et al., 1984). Using the SAA tool of the GIS software, a 250 m resolution raster was created by calculating the straight-line distance from each cell to the urban settlement feature layer of the Madrid region. From each record, a corresponding value was extracted from this raster layer. Data for the 11,238 livestock and 1,142 poultry farms in the study area were supplied by the Spanish Ministry of the Environment and Rural and Marine Affairs. Each sampling site was also assigned a value corresponding to its distance from the closest livestock and poultry farm using the spatial join-and-relate tool of the GIS software.

Modelling sand fly vector distributions

Two statistical approaches were used to predict the geographic distributions of the leishmaniosis vectors in the Madrid region. These models estimated vector densities as a count response regression, in which environmental and meteorological factors were used as explanatory variables. Both models assumed an overdispersed Poisson distribution of the data, which means that a negative binomial distribution was used instead of a Poisson distribution (Hilbe, 2007). The first model included corresponding land cover extractions, while the second included percentages of land cover categories in a buffer zone. The remaining environmental and meteorological variables were the same in both models. The model building strategy was: first, all factors were analyzed by bivariate analysis and then, starting with all variables showing a p-value lower than 0.2 in the bivariate analysis, multivariate backward stepwise regression was conducted. The likelihood ratio test was used to compare nested models and the Bayesian information criterion (BIC) was used to select the best models. To assess the predictive performance of the model, bootstrapping was performed with a 1,000 replicates to predict point-values and class values (using Jenks' natural breaks classification scheme) (Jenks and Caspall, 1971) of apparent density (AD) per trap square metre. R-squared was used to compare observed versus expected point values and the kappa statistic was then used to assess agreement after classifying the data in 5 groups. All statistical analyses were performed using Stata v.10.1 software (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). The level of significance was set at a p-value lower than 0.05.

Predictive maps for the Madrid region were drawn using the Raster Calculator of the GIS software through modelling on chartable raster layers. Models were constructed based on distance (250 m resolution straight-line distances), DEM (90 m resolution), land use (500 m resolution forest and shrubland percentage) and climatic layers (200 m resolution rainfall and temperature). The latter were created and provided free by the Autonomous University of Barcelona at <http://opengis.uab.es/wms/iberia/index.htm>.

Validating predictive maps

Over the years 2006 and 2007, in a survey of 1,076 dogs from 32 villages in the Madrid region, anti *Leishmania* specific antibodies were detected in 87 dogs using an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and a cut-off of 1/80 (Gálvez et al., 2010a). Moreover, 760 questionnaires designed for the EDEN-LEI project were sent to veterinary practitioners in December 2006 and March 2007. The questionnaire was designed to obtain data regarding the number of dogs examined in the past year at the veterinary clinic and the number of probable cases of CanL. 166 of these questionnaires were completed and returned, and the proportion of infected or sick dogs was calculated for each clinic with questions just mentioned. The locations of individual dogs and veterinary clinics were geocoded using the Geocoding tool of the GIS software on a street map layer for the Madrid province updated in 2004 (see Fig. 1).

Predictive sand fly distributions were categorized into 5 classes using Jenks' natural breaks classification scheme. Outlier values of sand fly distribution were classified as "not present" for the extreme minimum (1% of cases) and "maximum density" for the extreme maximum (1% of cases). Distances from dog reservoirs (1,076) and clinics (166) to each one of the classes were assigned using the spatial join-and-relate tool of the GIS software. Associations between infected dogs or proportions of infected dogs and distance to vector foci (or classes) were used to validate predictive maps.

Climate projections

Future climate projections were estimated from the seasonal mean temperature and precipitation data expected for the centre of the Iberian Peninsula in each

third of the 21st century (de Castro et al., 2005). We considered the results provided by an ensemble of six models (CCGM, CSIRO, HadCM3, NIES2, ECHAM4 and GFDL) called Atmosphere-Ocean General Circulation Model (AOGCM) using the two most used emission scenarios A2 and B2 (IPCC, 2007). In A2, greenhouse gas emissions and sulphate aerosols are predicted to rise at a more rapid rate than in B2. Maps of future sand fly distributions on the premise of the climate change scenarios were modelled, incorporating future climate projections.

RESULTS

Model outputs under current climate

Using two different but similar models, sand fly distributions were estimated by negative binomial regression using the data collected from the sampling sites.

Model 1 revealed that the variables distance to urban settlement (US), altitude and distance to nearest livestock farm (NLF) had an effect on vector densities (Table 1). The apparent density (AD) throughout the Madrid region was predicted by the following equation:

$$AD = e^{(4.67183 + \text{Distance to US} \times 0.05198 + \text{Altitude} \times (-0.18247) + \text{Distance to NLF} \times (-0.41696))}$$

Model 2 indicated that the AD for the Madrid area could be predicted from a linear combination of the variables (Table 1): mean spring rainfall, mean autumn temperature

Table 1. Multivariate factors correlated with *P. perniciosus* and *P. ariasi* densities in models 1 and 2.

Model	Predictor	Multivariate DR (95% CI)	p value	Coefficient	Constant
1	Distance to US (hm)	1.053 (1.020–1.088)	0.0010	0.05198	4.67183
	Altitude (hm)	0.833 (0.766–0.906)	0.0000	-0.18247	
	Distance to NLF (km)	0.659 (0.492–0.883)	0.0050	-0.41696	
2	Spring mean rainfall (mm)	0.710 (0.530–0.949)	0.0210	-0.342962	0.2654961
	Autumn mean temperature (°C)	1.296 (1.147–1.464)	0.0000	0.2591498	
	Distance to US (hm)	1.056 (1.023–1.090)	0.0010	0.0546671	
	% Forest & shrubland in a 500 m buffer	0.470 (0.228–0.969)	0.0410	-0.7546061	
	Distance to NLF (km)	0.670 (0.501–0.895)	0.0070	-0.4010263	

DR, Sand fly vector density ratio; CI, Confidence interval; US, Urban settlement; NLF, Nearest livestock farm; hm, Hectometres; km, Kilometres; mm, Millimetres; °C, Degrees Celsius.

ature, distance to US, percentage of forest and shrubland in a 500 m buffer and distance to NLF, according to the following equation:

$$AD = e^{(0.2654961 + \text{Spring rainfall} \times (-0.342962 + \text{Autumn temperature} \times 0.2591498 + \text{Distance to US} \times 0.00546671 + \% \text{Forest \& shrubland} \times (-0.7546061) + \text{Distance to NLF} \times (-0.4010263))}$$

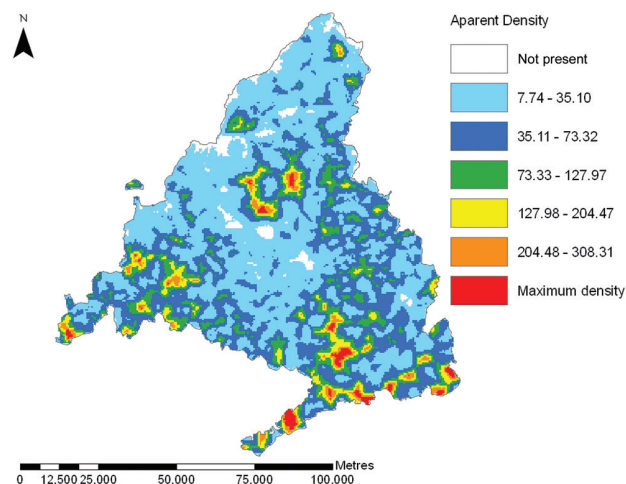
Percentage forest and shrubland in a 500 m buffer, distance to nearest livestock farm, mean spring rainfall and altitude were negatively correlated with vector density, such that the higher the value of the factor (for example, the greater the distance to the nearest farm), the lower the density of the vectors. In contrast, mean autumn temperature and distance to urban settlement were positively correlated with vector density.

The exponentiated coefficients of the models are interpreted as sand fly vector density ratios (DR), which means that for every unit increase in the value of a factor (for example a one degree increase in mean autumn temperature), the vector density will increase by 29.6% in the following year.

Bootstrap values indicated that model 2 [R-squared=0.45; 95%CI (0.23–0.73)] performed better on predicting point-values of AD than model 1 [R-squared = 0.37; 95% CI (0.19–0.71)]. Moreover, for model 2, observed agreement (79.7%) was significant (p = 0.0068), though expected agreement was also high (75.3%) when AD was classified into 5 classes using Jenks’ natural breaks scheme.

We then constructed two 500 m resolution maps to predict the distributions of the leishmaniosis vectors in the Madrid region, using the environmental and meteorological risk factors identified in the models mentioned above. As shown in Fig. 2, the maps are fairly similar, although class values are slightly lower for model 1. High vector density areas can be seen in the south-east, south-west and centre of the Madrid region.

MODEL 1



MODEL 2

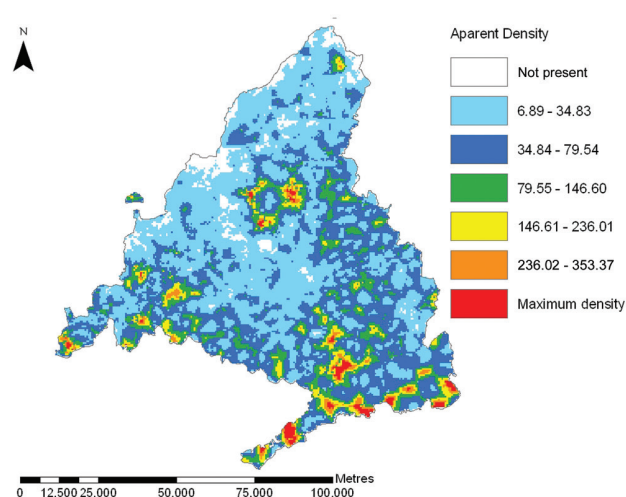


Fig. 2. Predicted spatial distribution of the leishmaniosis vectors by models 1 and 2.

Table 2. Changes in mean autumn temperature (°C) and mean spring rainfall (mm/day) projected by the AOGCM ensemble for the central Iberian Peninsula.

Period	Scenario	Designation in Fig. 3	Mean autumn temperature rise (°C)	Mean spring rainfall reduction (mm/day)
2010-2040	A2	A	1.4	0.21
	B2	D	1.6	0.25
2040-2070	A2	B	2.9	0.28
	B2	E	2.6	0.33
2070-2100	A2	C	4.9	0.53
	B2	F	3.7	0.30

mm, Millimetres; °C, Degrees Celsius; AOGCM, Atmosphere-Ocean General Circulation Model

The two maps were validated by considering means of distances from individual dogs and veterinary clinics to each of the 5 different classes used to classify vector density. Since the results for both maps were similar, only those for model 2 are shown. Thus, dogs seropositive for CanL appeared closer ($p = 0.048$) to the zones of higher ADs (>79.55). The clinics reporting a higher incidence of CanL were also correlated ($p = 0.0308$) with the areas showing higher ADs (>79.55). As no association was found below this point, it may be stated that, according to model 2, areas with an AD greater than 79.55 are considered vector foci.

Predicted climate change effects

Through the six-model AOGCM ensemble, the predicted spread of AD was computed using the GIS software for each third of the 21st century under the two emission scenarios A2 and B2 (Table 2). Distribution and abundance vector forecasts were based only on climate shifts. Although other risk factors such as land use will obviously intervene, these are hard to predict with much confidence and the complex methods needed are beyond the scope of this study. Thus, although both models behaved similarly, only model 2 was used for the simulations since it includes variables based on

SCENARIO A2

SCENARIO B2

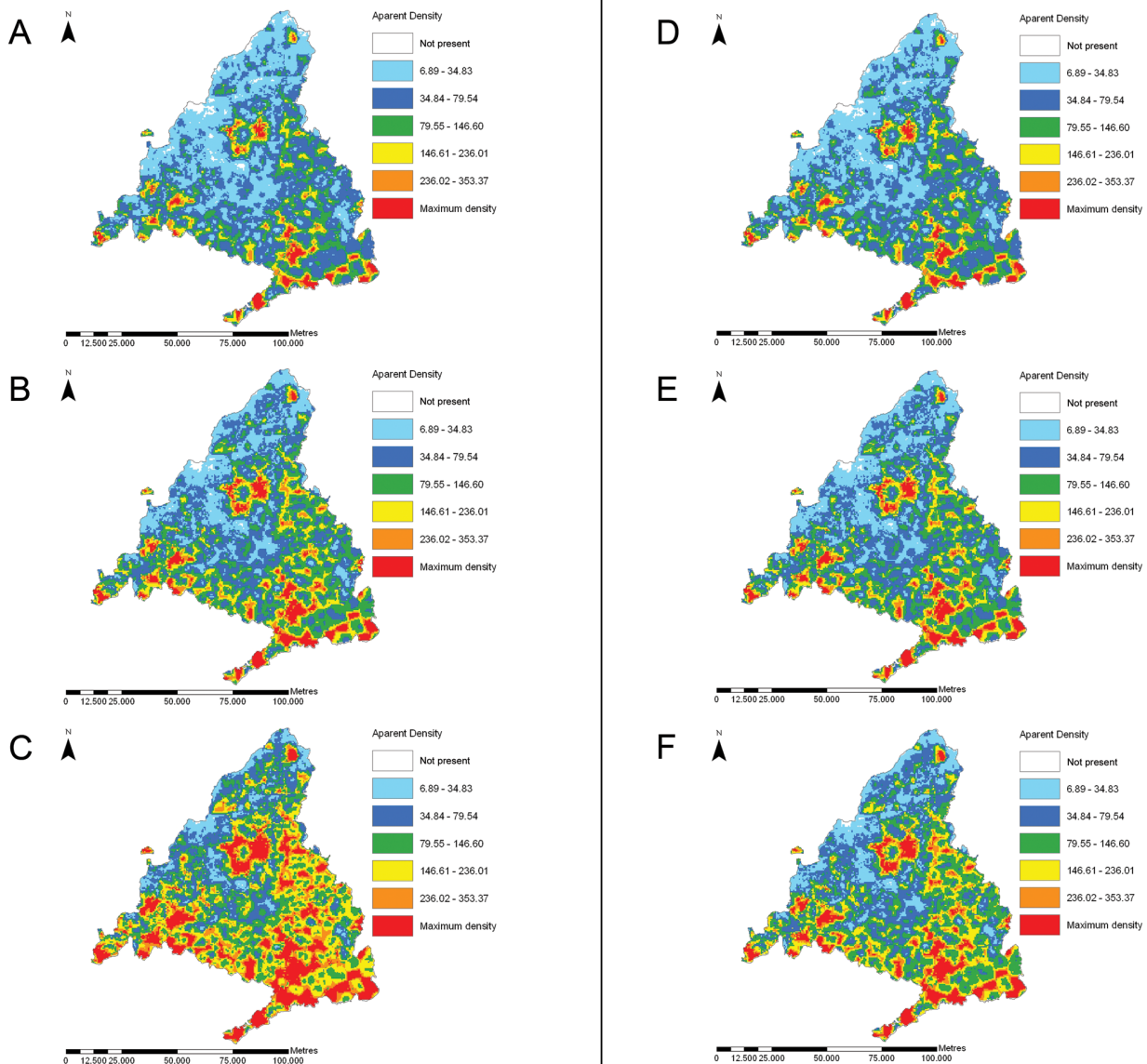


Fig. 3. Predicted future distribution by the AOGCM ensemble for the leishmaniosis vectors for each third of the 21st century under the A2 emission scenario: A: 2010-2040; B: 2040-2070; C: 2070-2100; and B2 emission scenario: D: 2010-2040; E: 2040-2070; F: 2070-2100.

climate. Simulated climate change predicted increased vector densities and affected areas (Fig. 3). The risk of spread is greater for the A2 than the B2 scenario and is especially high for the last part of the century compared to the current situation.

DISCUSSION

To understand sand fly vectorial capacities, knowledge of their specific environmental requirements is essential. In this study, we explored the effects of chartable environmental and meteorological variables on vector densities to map their predicted current distribution in the Madrid region. The environmental and meteorological factors considered have been previously observed to affect vector distributions in this region (Gálvez et al., 2010b).

Model 1 was based on altitude rather than the land cover (percentage forest and shrubland) and meteorological variables used in model 2, indicating that altitude encompasses the effects of both climate and vegetation factors. Thus, model 2 may be considered more appropriate from an ecological standpoint. Although our models could be improved, environmental and meteorological factors rise as decisive for modelling sand fly distributions. Since we did not include animal reservoir, *Leishmania* parasite, and/or leishmaniosis disease data in the models, the maps do not reflect the distribution of the disease. Notwithstanding, in a recent study the average prevalence of CanL was estimated to have increased from 5.25% to 8.1% in the last 15 years among the non-stray dogs in Madrid region (Gálvez et al., 2010a). Moreover, spatial association detected between infected dogs and proportion of infected dogs to modelled vector focus determines that vector density could be used as an indicator of infection risk in a given area.

The percentage forest and shrubland around each site was the factor least correlated with vector densities, probably because these sand flies seem to show a preference for more anthropogenic environments. Conversely, higher vector densities were recorded at sites far from very urban settlements. Thus, it seems that a balance between anthropogenic (urban settlements) and wild (forest and shrubland) environments (e.g., residential areas) maintains these parasite vectors in peak condition. A nearby livestock farm usually leads to increased vector densities. In a study performed in Brasil, the proximity of livestock, pigpens or hen houses significantly increased the risk of CanL (Moreira et al., 2003). In the present study, mean rainfall recorded in the preceding spring was negatively correlated with vector densities probably because, as other authors have suggested, high rainfall conditions could damage larval habitat and reduce phlebotomine abundances (Ghosh et al., 1999; Rossi et al., 2008). Higher mean temperatures in the preceding autumn gave rise to high

her vector densities. Thus, mild weather in the autumn could delay the beginning of diapause, increasing the larval population that reaches the fourth instar. Altitude was negatively correlated with vector densities. As altitude increases, vegetation changes, temperature decreases (according to the thermal gradient at a rate of -0.6°C per 100 m) and precipitation increases. Thus, an increased altitude will provide a more hostile environment for sand fly survival. In Sudan, it has been determined through map modelling that average rainfall and altitude are the best predictors of the incidence of leishmaniosis (El-naiem et al., 2003).

In recent years, several leishmaniosis risk maps have been produced, based on environmental factors such as altitude and rainfall (El-naiem et al., 2003), NDVI and land surface temperature (LST) (Gebre-Michael et al., 2004) or altitude and land use (King et al., 2004). Recently, the first risk map for CanL in France have been developed based on environmental variables and human-dog densities (Chamaille et al., 2010).

In central Spain (mainly in the Madrid region) vector densities a few years ago were significantly higher than densities reported 17 years earlier (Gálvez et al., 2010b). In Spain, the past 30 years have definitely seen a generalised temperature rise, whereas precipitation has shown no clearly defined trend (de Castro et al., 2005; Bladé et al., 2010). This suggests that vector densities could continue to rise, and by examining the effects of climate change we should be able to confirm this trend.

The climate change simulated returned enhanced vector densities and expansion of their distribution range. The risk of spread was greater for the A2 scenario than for the B2 scenario, because of the higher estimated anthropogenic emissions of the former. The expansion of suitable sand fly habitats was predicted. In addition, simulated climate change predicted a 3-fold increase in apparent vector densities over the period 2070–2100 under scenario A2, compared to the current situation. Since vector, host and pathogen populations intersect within a permissive environment to enable pathogen transmission (Reisen, 2010), if conditions for one of these, such as the vector, improve as predicted by our data, this could lead to improved disease transmission in the region. Predicted leishmaniosis vector-reservoir spread under the premise of climate change (IPCC, 2007) has been reported for three *Lutzomyia* species in south Brazil for 2040–2069 (Peterson and Shaw, 2003), and northwards for two *Lutzomyia* and four reservoir species in the US in 2020, 2050 and 2080 (González et al., 2010). Global change, including the development of new areas, changing agricultural practices, changing land uses and climate change, contributes to the spread of leishmaniosis (Ready, 2008).

In the interest of public health, there is a need for research targeted at the prediction, prevention, diag-

nosis, treatment, and prevention of leishmaniasis. Information on the prevalence and geographical distribution of infection is required for the installation of control measures and their surveillance thereafter. GIS and remote sensing technology are useful tools for analysing spatial and temporal landscape features that will help identify target populations and also serve to address the behaviour of the disease and its vectors so that effective control measurements may be implemented.

The vector distribution maps and predictive models established in this study provide information on the ecology of the leishmaniasis vectors in the Madrid region, on which to base appropriate and focused control measures against human and canine leishmaniasis infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Spanish Ministry of the Environment and Rural and Marine Affairs for provided meteorological data through the Spanish Meteorological Agency (AEMet) and data on the livestock and poultry farms registered in the study area. We also thank the Madrid Veterinary Association (AMVAC) for sending the questionnaires to its members and veterinarians who kindly answered the questionnaires. We thank Paul Ready, Jonathan Cox and Clive Davies for formulating the general approach to EDEN-LEI project and advising on some practical aspects of samplings and analysis. Jorge Barón helped with the design of the figures.

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III and the EU FP6 project "EDEN" (GOCE-2003-010284), Subproject EDEN-LEI, catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN 0233 (www.eden-fp6project.net). The contents of this manuscript are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

REFERENCES

- Amela C, Méndez I, Torcal JM, Medina G, et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol* 1995; 11:157-161.
- Antonioni M, Messaritakis I, Christodoulou V, Asco-silaki I, et al. Increasing incidence of zoonotic visceral leishmaniasis on Crete, Greece. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:932-934.
- BECM. Zoonosis. Comunidad de Madrid, años 2002 - 2004. *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid* 2005; 11:47-77.
- Bladé I, Cacho I, Castro-Díez Y, Gomis D, et al. Clima en España: pasado, presente y futuro. Informe de evaluación del cambio climático regional, 2010 Red Temática CLIVAR-España
- Conesa Gallego E, Romera Lozano, H & Martínez Ortega, E. Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Comunidad de Madrid (España). *Anales de Biología* 1997; 22:43-50.
- Cross ER, Hyams KC. The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Environ Health Perspect* 1996; 104:724-727.
- Cross ER, Newcomb WW, Tucker CJ. Use of weather data and remote sensing to predict the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54:530-536.
- Chamaille L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, et al. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasit Vectors* 2010; 3:31.
- Chargui N, Haouas N, Gorcii M, Akrouit Messaidi F, et al. Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite* 2007; 14:247-251.
- de Castro M, Martín-Vide J, Alonso S. The climate of Spain: past, present and scenarios for the 21st century. A preliminary assessment of the impacts in Spain due to the effect of climate change, 2005, Ministry of Environment, Spain.
- Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1013-1018.
- Elnaiem DE, Schorscher J, Bendall A, Obsomer V, et al. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:10-17.
- Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, et al. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 2010a; 169:327-334.
- Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, et al. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniasis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop* 2010b; 115:95-102.
- Gebre-Michael T, Malone JB, Balkew M, Ali A, et al. Mapping the potential distribution of *Phlebotomus martini* and *P. orientalis* (Diptera: Psychodidae), vectors of kala-azar in East Africa by use of geographic information systems. *Acta Trop* 2004; 90:73-86.
- Ghosh K, Mukhopadhyay J, Desai MM, Senroy S, et al. Population ecology of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) in West Bengal, India. *J Med Entomol* 1999; 36:588-594.
- González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, et al. 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.
- Hilbe JM. Negative binomial regression, 2007 Cambridge University Press, New York, Cambridge, United Kingdom.

- IPCC. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, et al, ed.
- Jenks G, Caspall F. Error on choroplethic maps: definition, measurement, reduction. *Ann Assoc Am Geogr* 1971; 61:217-244.
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4:1-24.
- Killick-Kendrick R, Rioux JA, Bailly M, Guy MW, et al. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Ann Parasitol Hum Comp* 1984; 59:555-572.
- King RJ, Campbell-Lendrum DH, Davies CR. Predicting geographic variation in cutaneous leishmaniasis, Colombia. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:598-607.
- Kitron U. Landscape ecology and epidemiology of vector-borne diseases: tools for spatial analysis. *J Med Entomol* 1998; 35:435-445.
- Kitron U. Risk maps: transmission and burden of vector-borne diseases. *Parasitol Today* 2000; 16:324-325.
- Lucientes Curdi J, Sánchez Acedo, C., Castillo Hernández, J.A., 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.
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, et al. 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-Sánchez J, Guilvard E, Acedo-Sánchez C, Wolf-Echeverri M, et al. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *Int J Parasitol* 1994; 24:405-408.
- Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, et al. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:795-798.
- Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, et al. Leishmaniasis and the Cyprus Paradox. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82:441-448.
- Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, et al. A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res* 2007; 101:253-257.
- Moreira ED, Jr., de Souza VM, Sreenivasan M, Lopes NL, et al. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69:393-397.
- Peterson AT, Shaw J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int J Parasitol* 2003; 33:919-931.
- Ready PD. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech* 2008; 27:399-412.
- Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* 2010; 15:19505.
- Reisen WK. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol* 2010; 55:461-483.
- Rioux JA, Guilvard, E., Gallego, J., Moreno G., Pratlong, F., Portús, M., Rispaill, P., Gallego, M., Bastien, P. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer: Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). In: *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Éco-Épidémiologiques (IMEEE, ed), 1986, 439-444, Montpellier.
- Rioux JA, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Turner DP, et al. [Ecology of leishmaniasis in the south of France. -- 12. Horizontal dispersion of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Preliminary experiments (author's transl)]. *Ann Parasitol Hum Comp* 1979; 54:673-682.
- Rioux JA, Perieres J, Killick-Kendrick R, Lanotte G, et al. [Ecology of leishmaniasis in south France. 17. Sampling of *Phlebotomus* by the method of adhesive traps. Comparison with the technic of capture on human bait]. *Ann Parasitol Hum Comp* 1982; 57:631-635.
- Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, et al. 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.
- Thomson MC, Elnaiem DA, Ashford RW, Connor SJ. Towards a kala azar risk map for Sudan: mapping the potential distribution of *Phlebotomus orientalis* using digital data of environmental variables. *Trop Med Int Health* 1999; 4:105-113.

V. DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

Los seres humanos siempre han dependido en alguna medida de los animales, bien como fuente alimenticia, medio de transporte, herramienta de trabajo, ocio o simplemente como animales de compañía (perros y gatos sobre todo). El perro lleva miles de años cooperando con el ser humano en las labores de caza, en la protección y manejo del ganado y en la defensa de las cosechas. La contribución del gato ha consistido fundamentalmente en la captura de los roedores, evitando de este modo el contacto de éstos con los seres humanos y protegiendo al mismo tiempo los graneros. Actualmente cabe destacar la terapia asistida con algunos animales - perros, caballos, delfines, etc. -, como herramienta de trabajo en personas que sufren trastornos psíquicos, lesiones cerebrales importantes o condiciones de exclusión social (autismo, ancianos, presos...). De este modo, el animal se comporta como un puente de comunicación entre el terapeuta y el paciente facilitando la recuperación, rehabilitación, reinserción, tratamiento, y mejora de la calidad de vida de determinadas personas. Pero en contrapartida los animales también son el origen de un buen número de zoonosis víricas, bacterianas y parasitarias. La LVH es un ejemplo de zoonosis parasitaria transmitida además por artrópodos. El perro es, sin duda, el principal reservorio doméstico de *L. infantum*. Por tanto, la Lcan representa no sólo un problema de índole veterinario sino también de salud pública, debido al alto porcentaje de perros infectados presente en zonas endémicas.

En los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral se evalúan los factores sociodemográficos, epidemiológicos, medioambientales y meteorológicos que pueden estar influyendo sobre los focos de transmisión activa de la Lcan en la Comunidad de Madrid (CM). Se evalúa también qué **factores de riesgo** están asociados con la seroprevalencia de la Lcan y con la densidad de sus vectores (*P. ariasi* y *P. perniciosus*). Adicionalmente, se describe la **dinámica estacional** de los flebotomos. La información obtenida a través de estas investigaciones orientará en el diseño de estrategias eficaces destinadas a prevenir la infección por *L. infantum* y la aplicación de éstas en las épocas del año en las que el riesgo de transmisión sea mayor.

Se han construido, con la ayuda de un SIG, **mapas predictivos de la abundancia de los flebotomos** vectores en la CM mediante la conversión de modelos de regresión múltiple, basados en variables medioambientales y meteorológicas, en modelos espaciales. Estos mapas, que orientan sobre la distribución espacial de los vectores en la región, tienen el propósito de dar a conocer qué zonas precisan de medidas más urgentes en la aplicación de estrategias de control antivectorial.

Se ha analizado el cambio acaecido, tanto en la seroprevalencia de la Lcan como en la densidad de los flebotomos vectores, comparado con estudios realizados en el pasado en las mismas localidades o en sus proximidades. El aumento observado tanto de la infección por *L. infantum* como de las densidades de sus vectores induce a reflexionar acerca del papel que podría estar jugando el cambio global en el incremento de la transmisión de la infección. Para conocer cuál es el impacto que el cambio global podría ocasionar, se han construido simulaciones de la futura dispersión del vector en la CM. De entre todos los componentes del cambio global, la premisa del cambio climático ha sido la única que se ha manejado ya que aunque se espera el cambio de otras variables medioambientales, como es el caso de los usos del suelo, sólo las variables climáticas se pueden predecir con fiabilidad. El pronóstico de la dispersión de los vectores a lo largo del siglo XXI podría ir asociado a un incremento del riesgo de expansión de la Lcan en la región estudiada, lo que confirmaría la tendencia ascendente documentada previamente para esta zoonosis (Gálvez y col., 2010a; Gálvez y col., 2010b).

V.1. ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

El valor de la seroprevalencia de la Lcan obtenido en el presente trabajo fue del 8,1%, superior al obtenido en estudios previos realizados también en perros de compañía de la CM, mediante el mismo método de diagnóstico (IFI) y título de corte ($\geq 1/80$). Los valores de seroprevalencia obtenidos en estudios previos llevados a cabo en la CM fueron 5,25% en hábitat rural y periurbano (Amela y col., 1995) y 4,7% en hábitat urbano y periurbano (Celaya, 1993; Castañeda y col., 1999). La seroprevalencia obtenida en este estudio durante el bienio 2006-2007 ha sido, sin embargo, inferior a la observada en perros vagabundos en la CM en el año 2006, que se situó en un 11,2% (Miró y col., 2007b). Las diferencias encontradas en la seroprevalencia de la Lcan entre perros de compañía y vagabundos, se podrían atribuir al hecho de que éstos últimos carecen del manejo clínico veterinario y de las medidas profilácticas y preventivas adecuadas. Además los perros vagabundos, que suelen vivir fundamentalmente a la intemperie, se encontrarían más expuestos a la picadura de los flebotomos que los perros de compañía (Dye y col., 1992; Amusátegui y col., 2004).

La razón de proporción⁽¹⁾ obtenida al comparar la seroprevalencia de la Lcan del presente estudio con la obtenida por Amela y col. (1995), 15 años antes, pone de manifiesto un aumento global significativo de 1,54 veces, evidenciándose diferencias más acusadas entre la población canina de más edad. Al ajustar la razón de proporción por determinadas variables que se podrían comportar como variables de confusión⁽²⁾: edad, peso y actividad desempeñada, la razón incluso aumenta, obteniéndose un incremento de 1,67 veces. Por tanto, se descartó que

⁽¹⁾ Razón de proporción: Manera de comparar dos valores expresados en la misma unidad de medida.

⁽²⁾ Variable de confusión: Variable que distorsiona la medida de la asociación entre otras dos variables.

las diferencias encontradas entre ambos estudios pudieran ser atribuidas a las oscilaciones de dichas variables sociodemográficas. Existen numerosos estudios en los que se detecta un aumento de la seroprevalencia de la Lcan en la cuenca mediterránea. En la isla de Creta se han desarrollado modelos estadísticos que concluyen que la seroprevalencia de la Lcan ha aumentado entre 2,2 y 3,8 veces en los últimos 17 años (Antonίου y col., 2009). En la isla de Chipre, Mazeris y col. (2010) han documentado un aumento de 9 veces en la seroprevalencia actual de la Lcan, que llega a alcanzar un 14,9%, con respecto a la reportada 10 años antes. En las Alpujarras granadinas se ha puesto de manifiesto el incremento paulatino de la seroprevalencia de la Lcan en el piso bioclimático mesomediterráneo a lo largo de un periodo de 22 años (1984-2006), pasando de un 9,2% en 1984 a un 15,4% en 1991, para alcanzar el máximo en 2006 con un 20,1% (Martín-Sánchez y col., 2009). En Portugal se ha detectado un incremento de la seroprevalencia de la Lcan en los últimos 10 años que los propios autores atribuyen al aumento de las poblaciones del vector como consecuencia de cambios medioambientales (Cardoso y col., 2004). Asimismo, en las últimas décadas se ha documentado la expansión geográfica de la Lcan en Túnez desde la región meridional hacia la septentrional, área considerada tradicionalmente libre de la enfermedad (Chargui y col., 2007).

Los valores del número de reproducción básico⁽³⁾ (R_0), homogéneo/no homogéneo, calculados por Amela y col. (1995) en 1992 fueron 1,06/1,07. En el presente estudio, estos valores aumentaron hasta 1,09/1,10, respectivamente. El incremento del valor de R_0 , tanto homogéneo como no homogéneo, evidencia un aumento en la transmisión de la infección por *L. infantum*. Estos incrementos, tanto de la seroprevalencia como de la transmisión de la infección, podrían ser consecuencia de los cambios climáticos y medioambientales, fruto del impacto causado por el ser humano sobre su entorno. Dicho impacto puede desencadenar un aumento en las densidades y en la distribución geográfica tanto de los vectores como de los reservorios de la enfermedad (Peterson y Shaw, 2003; González y col., 2010). El hecho de que sea en el grupo de perros de más edad donde el incremento de la seroprevalencia sea más acusado, podría explicarse por el aumento en la expectativa de vida de los animales enfermos, consecuencia de una mejora en el manejo clínico veterinario en los últimos años.

La fuerza de infección⁽⁴⁾ (λ) estimada para perros de trabajo/perros de compañía reflejada en el estudio de Amela y col. (1995) es de 0,035/0,059, respectivamente. En el presente estudio se alcanzaron unos valores de 0,03/0,019. En el grupo de perros de compañía se detectó un importante declive en la proporción de perros

⁽³⁾ Número de reproducción básico (R_0): Cifra media de infecciones producidas directamente por un caso infeccioso durante su periodo de transmisibilidad cuando irrumpe en una población totalmente susceptible.

⁽⁴⁾ Fuerza de infección (λ): Proporción de individuos sanos que desarrollan la enfermedad en un periodo de tiempo concreto.

sanos que enferman, hecho que probablemente sea debido a la mejora que ha experimentado la calidad de vida de éstos en los últimos 15 años. La mayor eficacia de las medidas profilácticas, el uso generalizado de las mismas y la notable mejora en el manejo clínico de los perros experimentada en los últimos años, podrían explicar esta tendencia. En la región central de Italia la incidencia de la Lcan disminuyó entre la población canina de una perrera tras cuatro años utilizando de forma combinada medidas terapéuticas (antimoniales y alopurinol) y profilácticas (pipetas con imidacloprid y permetrín) (Podaliri Vulpiani y col., 2009).

La distribución de la leishmaniosis se encuentra limitada geográficamente por la presencia del binomio vector-reservorio, cuyos requisitos medioambientales específicos determinan los focos de transmisión activa de la enfermedad (Ashford, 2000). El rango altitudinal de las localidades muestreadas en el presente estudio se situó entre los 476 y los 1460 m, observándose grandes diferencias entre las seroprevalencias calculadas para cada municipio que oscilaron entre 0 y 16,1% (ver Fig. 1, Cap. 1, pag. 84). A pesar de que estadísticamente no se ha demostrado que estas diferencias estuvieran relacionadas con la altitud, las tres localidades situadas a más altura - Santa María de la Alameda (1460 m), Somosierra (1434 m) y Robregordo (1299 m) - fueron las únicas en las que no se detectó ningún perro seropositivo. Dichas poblaciones mostraron una densidad de vectores muy baja (menor de 5 flebotomos/ m²), o incluso nula. Parece por tanto poco probable la transmisión de la Lcan en las localidades de la CM que se sitúen a más de 1300 m de altitud, debido a la baja densidad de vectores presentes. Tradicionalmente se ha descrito que la Lcan posee un gradiente de morbilidad desde la costa hacia las regiones montañosas (Lanotte y col., 1978), siendo la altitud un factor limitante. No obstante, en este estudio no se han observado diferencias significativas en la seroprevalencia de la Lcan entre las poblaciones localizadas a altitudes inferiores a 1300 m. Tampoco se encontró relación entre la altitud y la seroprevalencia de la Lcan en un estudio realizado en Croacia (Zivicnjak y col., 2005). Dos muestreos realizados en las mismas localidades del Pirineo francés en 1994 y en 2007, observaron una tendencia inversa en las tasas de perros seropositivos encontrados en las localidades según se situaran en el valle o en las estribaciones de cadenas montañosas. Así, la seroprevalencia de la Lcan presentó un descenso de 11,67% a 2,72% en las localidades ubicadas en el valle, y ocurrió a la inversa de 1,43% a 11,32% en aquellas situadas en las estribaciones de cadenas montañosas. Los autores atribuyen el declive de la seroprevalencia en las localidades situadas en el valle, al uso masivo de collares de deltametrín durante el periodo de transmisión de la enfermedad. En cambio, según los mismos autores, el recrudecimiento de la infección por *L. infantum* reportada en perros que viven en áreas montañosas podría ser consecuencia del aumento en 1°C de las temperaturas desde 1994 hasta la fecha del estudio, 2007 (Dereure y col., 2009).

Tras analizar los sueros de 1076 animales, mediante la técnica de IFI, 87 de ellos presentaron una titulación de anticuerpos anti-*L. infantum* igual o superior a 1/80, lo que arrojó un valor de seroprevalencia del 8,1%. El 36,8% de los perros seropositivos no presentaron alteraciones clínicas asociadas a la enfermedad (Figura V.1). Estos perros infectados clínicamente sanos, al permanecer durante un largo periodo de tiempo sin manifestar signos clínicos compatibles, juegan un papel decisivo en la transmisión de la Lcan en zonas endémicas (Baneth y col., 2008). Parece ser que estos perros son capaces de desarrollar altos niveles de inmunidad celular, hecho que limitaría las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Cabral y col., 1998). Por tanto, la erradicación de la infección producida por *L. infantum* en perros dependerá en gran parte de las medidas de control que se tomen en este grupo de animales infectados, pero clínicamente sanos. En áreas endémicas se ha documentado que la infección por *L. infantum* está tan extendida entre la población canina, que los casos clínicos que realmente manifiestan la Lcan representan sólo la punta del iceberg (Baneth y col., 2008). En el presente estudio, la parte "visible" de la enfermedad - los animales infectados por *L. infantum* que mostraban signos clínicos y/o alteraciones clínico-patológicas asociadas - se encuentra representada tan solo por el 5% de la población estudiada.

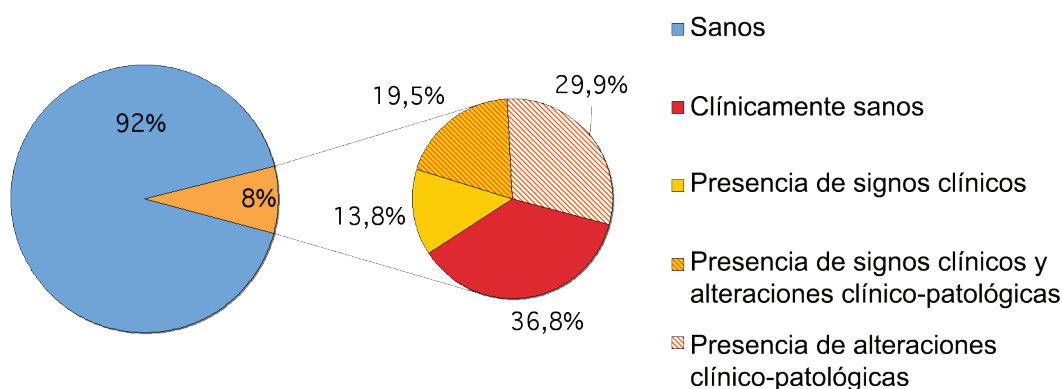


Figura V.1. Clasificación de los perros estudiados en el bienio 2006-2007 en relación con su estado clínico.

Los factores que se encontraron asociados a la presencia de la infección por *L. infantum* en el perro fueron edad, peso, tamaño, lugar de residencia, lugar de pernocta y actividad realizada (ver Tabla 2, Cap. 1, pag. 87).

El riesgo de infección se incrementó con la edad. Esta correlación también ha sido evidenciada en el centro de Italia (Maresca y col., 2009), en el suroeste de España (Martín-Sánchez y col., 2009) y en la isla de Chipre (Mazeris y col., 2010). La seroprevalencia presentó dos elevaciones, una en perros jóvenes (1-2 años) y otra

más pronunciada en perros adultos (7-8 años) (ver Fig. 2, Cap. 1, pag. 88). Otros autores han descrito el mismo patrón de distribución (Abranches y col., 1991; Amela y col., 1995; Miranda y col., 2008), que puede explicarse por el hecho de que los individuos más susceptibles desarrollarán la enfermedad a una edad más temprana. En cambio, en los animales más resistentes aunque también se hayan infectado a una edad temprana la infección quedará latente y no se activará hasta que la respuesta inmune se deteriore con la edad u otras situaciones de inmunosupresión (ej. enfermedades debilitantes, estrés, cirugías...) (Solano-Gallego y col., 2009).

El bajo peso y el pequeño tamaño aparecen como factores protectores frente a la infección. Esto puede ser atribuido a que a mayor peso y tamaño, mayor será la cantidad de superficie corporal expuesta a la picadura de los flebotomos. Por otro lado, es más probable que los perros de menor tamaño vivan en el interior de las casas y que por tanto estén menos expuestos al vector. Otros autores observan también cómo la seroprevalencia de la Lcan se asocia a un aumento de peso (Rondon y col., 2008; Martín-Sánchez y col., 2009). Los perros examinados en este estudio mostraron mayor seroprevalencia cuando vivían en el exterior (10%) que cuando lo hacían en perreras (6%) o dentro de las viviendas (3%). De forma paralela se detectaron diferencias significativas en los perros que pasaban la noche a la intemperie (11%) respecto a aquellos que permanecían en el interior de las casas (5%). Por tanto, un estilo de vida vinculado a la presencia constante de los perros en el exterior está significativamente asociado con la infección por *Leishmania*, debido al mayor tiempo de exposición del perro a los vectores (Ciaramella y col., 1997). Varios estudios han puesto de manifiesto para el perro que pasar la noche a la intemperie emerge como un factor de riesgo de la infección por *L. infantum* (Zaffaroni y col., 1999; Ait-Oudhia y col., 2009; Bashaye y col., 2009; Martín-Sánchez y col., 2009). Por tanto, los perros que vivan en el exterior de las viviendas, como por ejemplo los perros de guarda, estarán más expuestos a las picaduras de los flebotomos.

En la población canina estudiada todos los factores que se encontraron asociados a la infección por *L. infantum* en el análisis bivariante: edad, peso, tamaño, lugar de residencia, lugar de pernocta y actividad realizada, están estrechamente ligados de forma directa o indirecta al tiempo de exposición al vector (ver Fig. 3, Cap. 1, pag. 89).

V.2. ESTUDIO DEL FLEBOTOMO VECTOR

Se ha descrito la presencia de cinco especies de flebotomos en el área de estudio. Fraile González ya encontró en 1983 las mismas especies en un muestreo realizado en la CM. En los muestreos realizados en el bienio 2006-2007, la especie

más abundante es *S. minuta* (71,56%) seguida por los dos vectores probados de la leishmaniosis en la Península Ibérica: *P. perniciosus* (24,93%) y *P. ariasi* (2,59%). El reducido número de ejemplares capturados de *P. sergenti* (0,8%) y *P. papatasi* (0,12%) no permite extraer conclusiones consistentes. En otro muestreo realizado en el año 1991 en la CM, también se identificó a *S. minuta* como la especie más abundante (50,8%) seguida de *P. perniciosus* (44,8%), mientras que se capturaron muy pocos ejemplares de *P. ariasi* (0,7%), menos incluso que de *P. papatasi* (2,6%) y *P. sergenti* (1%) (Conesa Gallego, 1994).

En el estudio realizado durante el bienio 2006-2007, *P. perniciosus* fue la especie más ampliamente distribuida encontrándose en 95 de los 123 puntos muestreados (77%). Conesa Gallego (1994) también observó que la distribución espacial de *P. perniciosus* fue la más vasta, localizándose en el 82,7% de las localidades muestreadas. Cabe destacar que las especies vectoras - *P. perniciosus* y/o *P. ariasi* - estuvieron representadas en el 83% de los lugares muestreados (103 sitios), lo que explicaría la alta endemicidad de la Lcan en el área estudiada (Amela y col., 1995; Miró y col., 2007b; Gálvez y col., 2010a). *Phlebotomus perniciosus* es ubicuista (Morosetti y col., 2009), siendo capaz de tolerar condiciones ambientales muy diversas. Esta especie ha sido capturada a lo largo de todo el gradiente altitudinal estudiado (463-1548 m) y de forma equilibrada en los dos pisos bioclimáticos mayoritariamente representados en el área de estudio, supramediterráneo y mesomediterráneo. *Phlebotomus ariasi*, al preferir climas más húmedos y fríos que *P. perniciosus*, fue localizado exclusivamente en un rango de 689-1548 m, principalmente en zonas montañosas del piso supramediterráneo (ver Fig. 1, Cap. 2, pag. 94). Otros autores también han destacado las preferencias de *P. ariasi* por zonas montañosas frías y húmedas (Rioux, 1986; Rispaill y col., 2002). En un muestreo realizado desde el valle del río Ebro hasta Valencia, *P. ariasi* fue capturado a partir de los 750 m de altitud y predominó sobre *P. perniciosus* en el piso supramediterráneo (Aransay y col., 2004). Se debería considerar cuál es el papel sinérgico que podrían jugar *P. perniciosus* y *P. ariasi* en la transmisión de la Lcan en las zonas de mayor altitud de la región estudiada, donde ambos vectores están presentes.

La proporción de sexos fue muy equilibrada en *S. minuta* ya que esta especie tiene predilección por los mismos orificios y oquedades donde se encuentran los reptiles de los que se alimenta. En cuanto a las especies del género *Phlebotomus* las capturas están claramente sesgadas hacia los machos (Figura V.2), probablemente porque los mechinales son mayoritariamente utilizados por éstos como lugares de reposo.

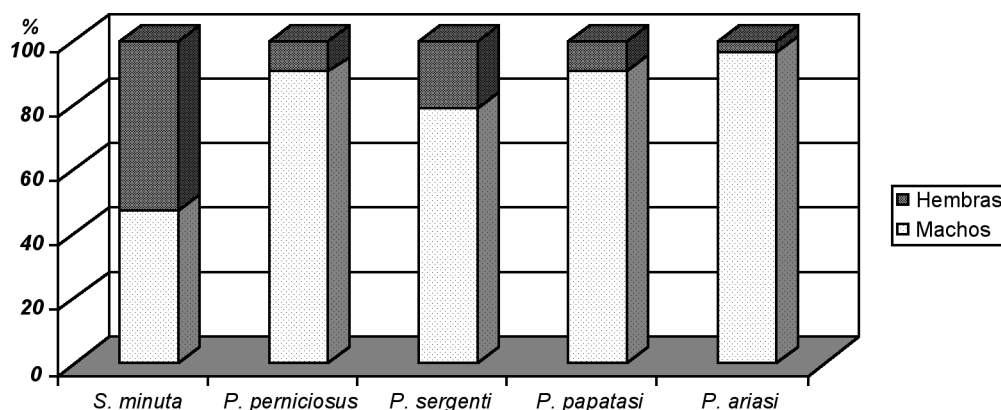


Figura V.2. Porcentaje de flebotomos capturados por especies y proporción de sexos.

Para comprender en profundidad la capacidad vectorial de los flebotomos, es esencial conocer sus requerimientos medioambientales específicos. Por consiguiente, se investigaron las variables medioambientales que influyen sobre el sumatorio de las densidades de las dos especies de vectores y en qué medida. Se detectaron densidades de vectores significativamente mayores en hábitat rural, en áreas no pavimentadas y en aquellos emplazamientos que estaban protegidos del viento y situados entre localidades. Sin embargo, el tipo de muro, la pendiente del punto muestreado, la construcción del muro o el interior del mechinal no influyeron sobre la densidad de vectores (ver Tabla 1, Cap. 2, pags. 96-97). La predilección de ambas especies de vectores por hábitat naturales y protegidos pone de manifiesto su preferencia por ambientes poco alterados (Morosetti y col., 2009). Se capturaron mayores densidades de vectores en los muros orientados al este y al sur, debido probablemente a la disminución de horas de sol recibidas, que mantienen las condiciones de humedad y temperatura óptimas para los flebotomos. En Irak, se realizan más capturas de flebotomos con aquellas trampas situadas al noreste (Coleman y col., 2007).

La cercanía de animales de cría y de aves - principalmente gallinas - a los lugares de muestreo, aumentó de manera significativa las tasas de capturas de ambos vectores. En el suroeste de Marruecos *P. perniciosus* constituye gran parte de la microfauna presente en los establos (Guernaoui y Boumezzough, 2009). Estos autores, al capturar un gran número de machos con sus genitalias sin rotar, sugieren que *P. perniciosus* establece sus lugares de cría en las proximidades de los establos. En un estudio llevado a cabo en Colombia, donde se documentaron resultados similares, se detecta la presencia de machos recientemente emergidos cerca de las cochiqueras (Ferro y col., 1997). En Siria, la presencia de ganado podría ser la causa de las altas densidades de *P. papatasi* encontradas en Khan Toman (Maroli y col., 2009). En Nepal la proximidad de cabras positivas, detectadas mediante la técnica de PCR (Bhattarai y col., 2010) y DAT (Khanal y col., 2010), a los asentamientos humanos fue

el mayor factor de riesgo observado para la infección por *L. donovani* en el humano. Además, la presencia de gallinas en las inmediaciones de las casas podría estimular la transmisión de *L. infantum*, como ha sido sugerido para *L. longipalpis* en Brasil (Alexander y col., 2002) y Argentina (Fernández y col., 2010).

La altitud se correlacionó de forma negativa con la densidad de vectores. A medida que se asciende, la vegetación cambia, la precipitación aumenta y la temperatura disminuye en una tasa de 0,6°C por cada 100 m (Rivas-Martínez, 1983). Por tanto, un incremento en la altitud proporcionará un medio ambiente cada vez más restrictivo para la supervivencia de los flebotomos y para la extensión de su periodo de actividad estacional. Algunos autores ya han observado la correlación negativa que existe entre la altitud y la abundancia de flebotomos (Elnaiem y col., 1998; Ferreira y col., 2001; Gebre-Michael y col., 2004).

En el análisis bivalente, el encinar aparece como el tipo de vegetación más apropiado para ambos vectores y el robledal como el menos adecuado, mientras que los resultados del análisis multivalente apuntan en sentido contrario. Esta contradicción en los resultados, podría ser explicada porque la altitud influye sobre muchos factores, entre ellos la vegetación, por lo que en este caso la altitud podría aparecer como un factor de confusión entre la vegetación y las densidades del vector en el análisis multivalente.

Las variables microclimáticas medidas en el interior del mechinal, temperatura y humedad relativa, no parecen influir sobre las capturas del vector. Sin embargo, las variables meteorológicas temperatura y precipitación media diaria, recogidas en la estación meteorológica más cercana a cada punto de muestreo, estuvieron correlacionadas negativamente con la densidad de ambos vectores. La temperatura condiciona la supervivencia de los flebotomos y la velocidad de desarrollo de cada una de las etapas de su ciclo biológico (Elnaiem y col., 1998; Killick-Kendrick, 1999; Gage y col., 2008; Oshaghi y col., 2009; Reisen, 2010). De acuerdo con los resultados obtenidos, el registro de temperaturas extremas durante los cuatro días que duró el muestreo, o durante el mes precedente, limitaron de forma significativa la captura de ambos vectores. Según El-Badry y col. (2008), tanto los adultos como los estadios larvarios del vector son muy sensibles a las altas temperaturas y a la escasez de humedad. Las precipitaciones condicionan la supervivencia del vector al promover su desarrollo larvario y pupal y proporcionar además lugares de oviposición adecuados (Gage y col., 2008). En el presente trabajo, los valores de precipitación media diaria durante el mes o año previos a la realización del muestreo, estuvieron correlacionados negativamente con la densidad de ambos vectores. Algunos autores han correlacionado

los valores de precipitación con los de la densidad de flebotomos capturados (Ghosh y col., 1999; Salomón y col., 2004), excepto en condiciones de máxima pluviosidad (Ghosh y col., 1999; Rossi y col., 2008). La presencia de precipitaciones elevadas podría provocar la disminución en la población de flebotomos, debido al efecto de inundación y/o arrastre ocasionado por el lavado de los lugares de cría donde se encuentran sus fases larvarias.

El periodo de actividad que presenta cada especie de flebotomo, que afecta sobre sus mecanismos de regulación interna y ciclo biológico, está influenciado en gran parte por las condiciones climáticas y por los factores físicos medioambientales (Morillas Márquez y col., 1983; Benito-De Martín y col., 1991; Lucientes-Curdi y col., 1991). En el presente estudio *P. perniciosus* presenta una fluctuación de tipo difásica, con una elevación hacia el mes de julio y otra hacia el mes de septiembre, la misma distribución que muchos otros autores confirmaron previamente para esta especie en España (Morillas Márquez y col., 1983; Lucientes Curdi, 1986; Sanchís Marín, 1986; Martínez Ortega y Conesa Gallego, 1987; Botet y col., 1989; Morillas Márquez y col., 1991; Seguí, 1991a, b; Wolf Echeverri, 1996; Castillejo, 2007). *P. perniciosus* se perfila como el principal vector de *L. infantum* en España, debido a la extensión de su periodo de actividad, su amplia distribución geográfica y su abundancia respecto al segundo vector probado, *P. ariasi* (Morillas Márquez y col., 1983; Encinas Grandes y col., 1988; Lucientes-Curdi y col., 1991). A diferencia de lo anterior, *P. ariasi* presentó una sola elevación de actividad en el mes de agosto, como se ha descrito previamente en Salamanca (Encinas Grandes y col., 1988), en el sur de Francia (Rioux y col., 1970), en Portugal (Pires, 1985) y en Cáceres (Rosado y col., 1995) (ver Fig. 3, Cap. 2, pag. 97). Ready y Croset (1980) sugirieron la posibilidad de que la única elevación de abundancia, manifestada en condiciones de laboratorio por *P. ariasi*, fuera resultado del solapamiento de generaciones. En el presente estudio, los máximos de actividad de ambos vectores tuvieron lugar siempre entre los dos máximos de lluvias, en primavera y otoño. La información obtenida a través del estudio fenológico de las especies de flebotomos vectores, orientará en el diseño de estrategias eficaces en las épocas del año durante las cuales el riesgo de transmisión sea mayor. Además, el hecho de que el periodo de actividad de los flebotomos esté regulado en gran parte por las condiciones climáticas, ha permitido la predicción de la densidad de *L. longipalpis* en Brasil y de *P. argentipes* en India y Nepal mediante la utilización de modelos de regresión multivariante basados únicamente en variables climáticas (Michalsky y col., 2009; Picado y col., 2010). En Brasil, Michalsky y col. (2009) han construido un modelo de regresión múltiple, con un buen valor de ajuste⁽⁵⁾ ($r^2=0,752$). Dicho modelo predice el número de individuos de *L. longipalpis* estimados cada mes (no. Ll), basándose en tres variables climáticas - precipitación acumulada,

⁽⁵⁾ Valor R-cuadrado: Número de 0 a1 que revela en qué grado se corresponden los valores estimados por un modelo con los observados.

temperatura media y humedad relativa media -, aplicando la siguiente ecuación: $no. Ll = -282.550 + (0.404 \times \text{precipitación}) + (35.464 \times \text{temperatura}) - (8.549 \times \text{humedad})$. En India y Nepal, se ha construido un modelo multivariante con un ajuste de un 57%, que explica la abundancia mensual de *P. argentipes* en base a una correlación positiva con la temperatura y negativa con la precipitación (Picado y col., 2010). En ambos estudios, los autores sugieren que la utilización de las variables climáticas como predictoras para estimar la densidad mensual de ambos vectores, facilitaría el uso adecuado de las medidas de control antivectorial y la estimación del riesgo de brotes de leishmaniosis en dichas regiones.

Se comparan los resultados obtenidos en el año 2008 con los obtenidos por Conesa Gallego (1994) en 1991 en un estudio fenológico realizado en la CM (ver Fig. 2, Cap. 2, pag. 94). Se confirma la ausencia de dos especies en el presente estudio (*P. langeroni* y *P. longicuspis*), como consecuencia de la diferencia de hábitat muestreados. La razón de proporción sin ajustar, que compara las densidades de *P. perniciosus* y *P. ariasi* de ambos estudios, evidenció un aumento significativo global sólo en *P. ariasi*, 16,02 veces en los últimos 17 años. Se ajustó la razón de proporción por las variables de confusión (A) y (B), resultado de las extracciones puntuales de dichas variables en cada sitio de muestreo con la ayuda de un SIG. Tras el ajuste, el riesgo de *P. ariasi* disminuyó más de la mitad pero manteniendo su significación, y en *P. perniciosus* al igual que en el sumatorio de ambas densidades, se evidenció un aumento significativo de la densidad (Tabla V.1). Por consiguiente, la densidad de ambas especies de vectores fue mayor en el estudio actual que en el realizado en 1991, mostrándose las diferencias más acusadas en *P. ariasi*.

	<i>P. ariasi</i>	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i> + <i>P. perniciosus</i>
RTI sin ajustar	16.02 (4.11-62.46)***	2 (0.87-4.64)	2.08 (0.93-4.66)
RTI ajustada ^(A)	6.23 (1.19-32.6)*	2.47 (1.09-5.6)*	2.63 (1.2-5.77)*
RTI ajustada ^(B)	8.1 (1.14-57.75)*	2.55 (1.04-6.31)*	2.65 (1.08-6.48)*

^(A) *P. ariasi*: altitud, orientación, vegetación; *P. perniciosus* y sumatorio de ambas especies: altitud, orientación, precipitación media; ^(B) Altitud, orientación, distancia a núcleo urbano, vegetación, precipitación media, temperatura media. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabla V.1. Razón de proporción de las densidades de vectores, entre el muestreo actual y el llevado a cabo en 1991 (Conesa Gallego, 1994).

No obstante, los resultados obtenidos deben ser interpretados con cautela, en primer lugar por el bajo número de lugares de muestreo que se comparan (16 sitios actuales vs 33 sitios históricos), y en segundo lugar porque los resultados mensuales fueron agregados para que fueran iguales a como fueron presentados

por Conesa Gallego (1994). Este aumento de las densidades de los vectores 17 años después, fundamentalmente de *P. ariasi*, podría ser debido al desplazamiento de sus poblaciones hacia zonas de mayor altitud debido al cambio global (Ready, 2008, 2010). Sin embargo, a día de hoy, resulta difícil predecir qué papel ejerce el cambio global y cuáles serán sus posibles efectos. Recientemente, en el norte de Italia se ha confirmado el aumento de las densidades de los vectores de Lcan - *P. perniciosus* y *P. neglectus* -, y la expansión septentrional de *L. infantum* en la Italia continental (Maroli y col., 2008; Morosetti y col., 2009).

V.3. CONSTRUCCIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS ESPACIALES Y TEMPORALES DEL FLEBOTOMO VECTOR

En el presente trabajo se ha analizado el efecto que tienen determinadas variables cartografiables, tanto medioambientales como meteorológicas, sobre la densidad de los flebotomos vectores. El objetivo ha sido la obtención de mapas predictivos de la "densidad aparente" (DAP) de los flebotomos vectores en la CM, a partir de la asociación entre las densidades puntuales obtenidas en las capturas y las variables explicativas del modelo. La influencia que ejercen estas variables medioambientales y meteorológicas sobre los flebotomos vectores se describió previamente para la misma región (Gálvez y col., 2010b).

Se obtuvieron dos modelos de DAP con una resolución espacial o tamaño de pixel de 500m (ver Fig. 2, Cap. 3, pag. 107). Se concluye que el modelo 2 ($r^2 = 0,45$) se ajusta mejor a los resultados observados que el modelo 1 ($r^2 = 0,37$). Aunque ambos modelos son susceptibles de ser mejorados, se pone de manifiesto que las variables medioambientales y meteorológicas resultan fundamentales en la construcción de modelos de predicción geográfica de los flebotomos vectores.

El modelo 1 viene explicado por la variable altitud, en lugar de por las variables meteorológicas (temperatura de otoño y precipitación de primavera) y de usos del suelo (porcentaje de bosque y matorral), esclarecidas por el modelo 2. Esto sugiere que en el modelo 1 la altitud se comporta como factor de confusión, ya que enmascara los efectos del clima y de la vegetación, siendo por tanto el modelo 2 más apropiado desde un punto de vista ecológico. Al no incluir en la construcción de los modelos información sobre el reservorio o el parásito, los mapas obtenidos no explican la expansión de la Lcan. No obstante en Madrid se ha documentado anteriormente que en los últimos 15 años ha habido un aumento significativo de la seroprevalencia de la Lcan, tras descartar que este incremento fuese atribuido a variables socio-demográficas de la población canina (Gálvez y col., 2010a). Además, la cercanía de los perros seropositivos y de las clínicas veterinarias con mayor incidencia de Lcan a

los focos de DAP del vector definidos por los modelos, confirman que las densidades del vector se encuentran estrechamente correlacionadas con la infección por *L. infantum*. Por tanto, las densidades de los vectores podrían ser utilizadas como un indicador del riesgo de aparición de la Lcan en un área determinada (Alam y col., 2009; Chelbi y col., 2009; Martín-Sánchez y col., 2009).

Dentro del área de influencia de 500 m de radio, centrada en cada punto de muestreo, un incremento del porcentaje de bosque y matorral conlleva una disminución de la densidad de vectores en ese punto. Este hecho indica que los flebotomos vectores muestran preferencia por ambientes más antropogénicos. En contraposición, aquellos puntos de muestreo que se encuentran a mayor distancia de los núcleos urbanos registraron valores de densidad superiores. Parece por tanto que la ponderación entre ambientes antropogénicos (asentamientos urbanos) y silvestres (bosque y matorral), como es el caso de las áreas residenciales, sería el escenario óptimo para la presencia del vector. Por otro lado, la cercanía a granjas de ganado emerge como un factor asociado al aumento del vector. En Brasil, la proximidad de granjas de ganado, cochiqueras o gallineros, incrementaron el riesgo de Lcan (Moreira y col., 2003). Las precipitaciones medias recogidas durante la primavera previa al estudio de campo presentaron una correlación negativa con respecto a las densidades del vector, probablemente debido a que los episodios de pluviosidad extrema son capaces de reducir las poblaciones de flebotomos y de sus lugares de cría (Ghosh y col., 1999; Rossi y col., 2008). El aumento de la temperatura media en el otoño precedente propicia el alza de las densidades del vector. Por tanto un otoño cálido podría retrasar el inicio de la diapausa, incrementándose así la población de larvas que alcanzaría el cuarto estadio larvario. La altitud se correlacionó de forma negativa con la densidad de vectores. Un incremento en la altitud proporciona por tanto un medio ambiente cada vez más restrictivo para la supervivencia de los flebotomos vectores.

En los últimos años se han generado diversos mapas de riesgo de leishmaniosis basados en factores medioambientales como la altitud y la precipitación (Elnaiem y col., 2003); índices de vegetación, NDVI, y medidas de la temperatura de la superficie terrestre, LST, (Gebre-Michael y col., 2004); altitud y usos del suelo (King y col., 2004). Recientemente se ha construido el primer mapa de riesgo de la Lcan en Francia basado en variables medioambientales y meteorológicas, así como en las densidades de las poblaciones humana y canina (Chamaille y col., 2010).

Los estudios de campo realizados fundamentalmente en la CM durante el año 2008 han confirmado el aumento significativo que han experimentado, 17 años después,

las dos especies de vectores presentes en la región (Gálvez y col., 2010b). Además, en los últimos 30 años, en España se ha observado un incremento significativo de las temperaturas junto con un descenso de las precipitaciones, aunque existe mayor incertidumbre respecto a la precipitación (de Castro y col., 2005; Bladé y col., 2010). Se pretende confirmar si esta tendencia ascendente en la abundancia de los vectores de la Lcan en el área de estudio, ha sido consecuencia del efecto que el cambio climático tiene sobre sus poblaciones.

Para simular la evolución futura del clima terrestre, los modelos climáticos globales (*Atmosphere-ocean general circulation model*, AOGCM) fueron modelizados en base a la evolución de los niveles de gases de efecto invernadero (GEI) pronosticada en dos escenarios, A2 y B2 (IPCC, 2007). La evolución de la precipitación y la temperatura en la Comunidad de Madrid a lo largo del siglo XXI se ha manifestado con una tendencia ascendente significativa con respecto a la temperatura máxima y mínima, y descendente con respecto a la pluviosidad (Figura V.3).

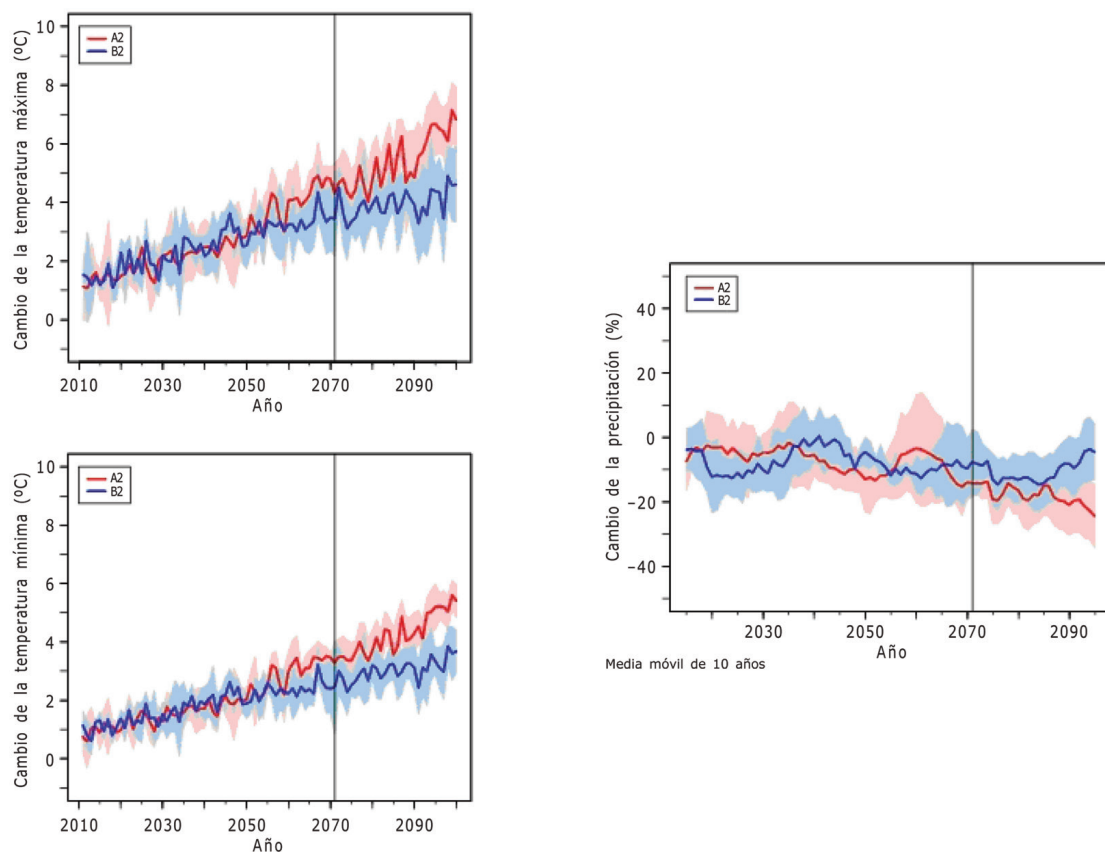


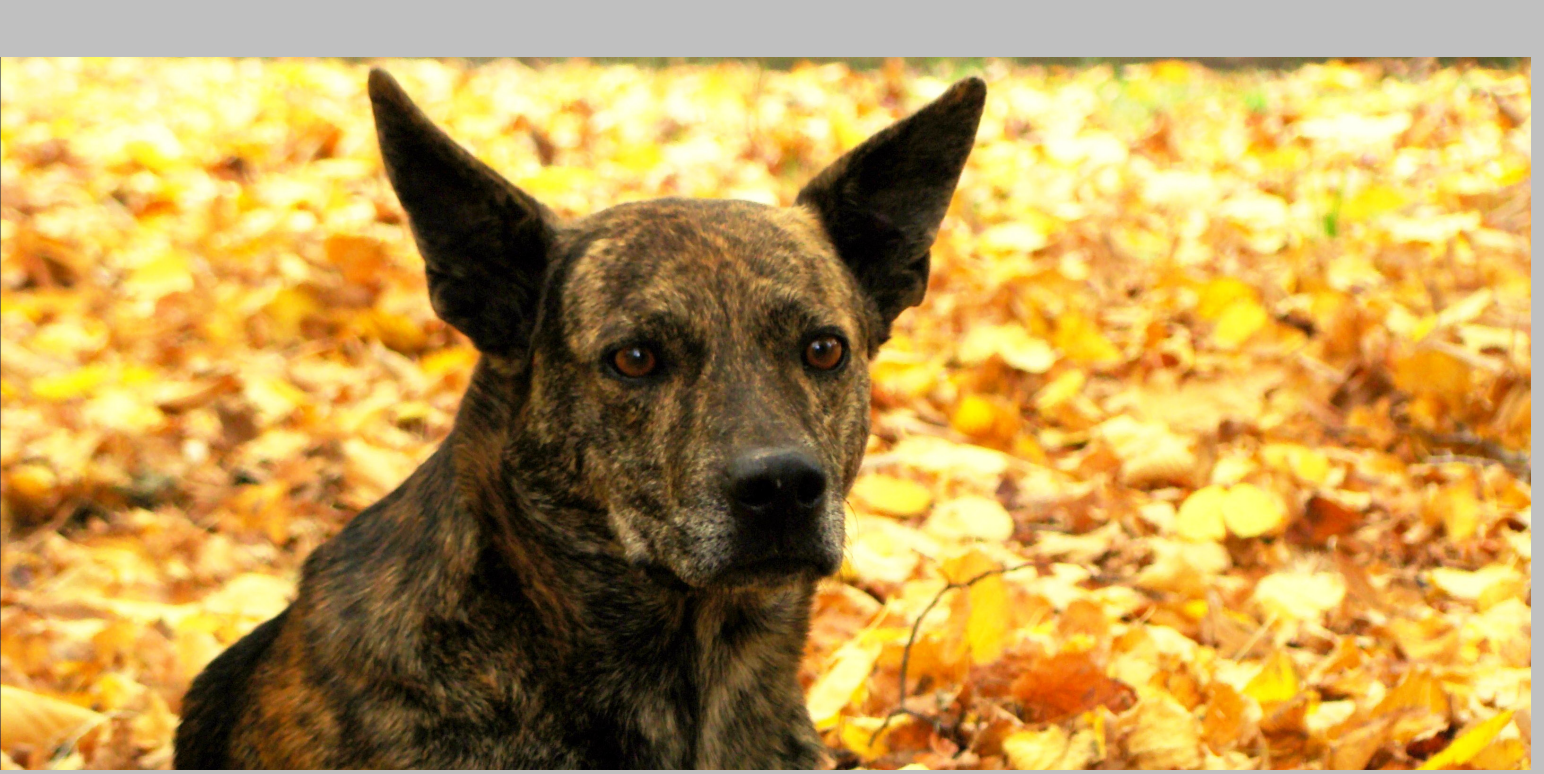
Figura V.3. Evolución de las temperaturas máxima y mínima, y de la precipitación anual media en la Comunidad de Madrid a lo largo del siglo XXI. Dichos valores se han obtenido con diferentes modelos globales, técnicas de regionalización y escenarios de emisión de gases (A2 y B2), respecto al valor promedio de referencia en el periodo 1961-1990 (Brunet y col., 2008).

Bajo la premisa del cambio climático se pronosticó el aumento de la DAP en la CM así como la expansión de sus áreas de riesgo. El grado de dispersión fue algo mayor en el escenario A2 que en el B2, debido a que el primero presenta una evolución de emisiones de GEI más creciente que el segundo (ver Fig. 3, Cap. 3, pag. 108). Mediante la construcción de estas predicciones futuras, ha sido vaticinada la expansión del hábitat favorable para los flebotomos a lo largo del siglo XXI. Además, las simulaciones de cambio climático pronostican un incremento de hasta 3 veces en la DAP en la CM durante el último tercio del siglo XXI y bajo el escenario A2, si lo comparamos con la predicción geográfica estimada para la situación presente. La transmisión de las enfermedades vehiculadas por vectores es posible cuando vector, hospedador y agente patógeno se entrecruzan en un medio ambiente favorable (Reisen, 2010). El incremento de uno sólo de los elementos que componen el ciclo de la Lcan, en este caso el vector, podría potenciar la dispersión del patógeno en la región estudiada. Algunos autores han denunciado la expansión tanto del vector como del reservorio de la leishmaniosis bajo la premisa del cambio climático. En el sur de Brasil, se ha predicho la expansión de tres especies de *Lutzomyia* durante el periodo 2040-2069 (Peterson y Shaw, 2003) y en Estados Unidos se pronosticó la dispersión septentrional de dos especies de *Lutzomyia* y cuatro especies de reservorios silvestres - ratas del género *Neotoma* - en 2020, 2050 y 2080 (González y col., 2010).

El uso combinado de los SIG e imágenes de satélite, asociado con el trabajo realizado sobre el terreno, ha posibilitado el desarrollo de mapas predictivos en el espacio y en el tiempo, cuya utilidad en estrategias de prevención y control de la Lcan es inestimable. Los mapas predictivos de la DAP de los flebotomos vectores en la CM, contruidos primero a nivel espacial y luego a nivel temporal, proporcionan la información necesaria para conocer los requerimientos ecológicos del vector y localizar geográficamente aquellas áreas que deban ser consideradas como prioritarias a la hora de aplicar medidas de lucha antivectorial.

Cabe destacar la fácil aplicación que tendrían estos modelos predictivos en otras zonas geográficas endémicas o potencialmente emergentes respecto a esta zoonosis. La capacidad de estos modelos radica en que pueden predecir el riesgo de expansión de la Lcan no solo con respecto a la altitud sino a la latitud, demostrando una expansión hacia zonas donde no se había reportado dicha zoonosis previamente.

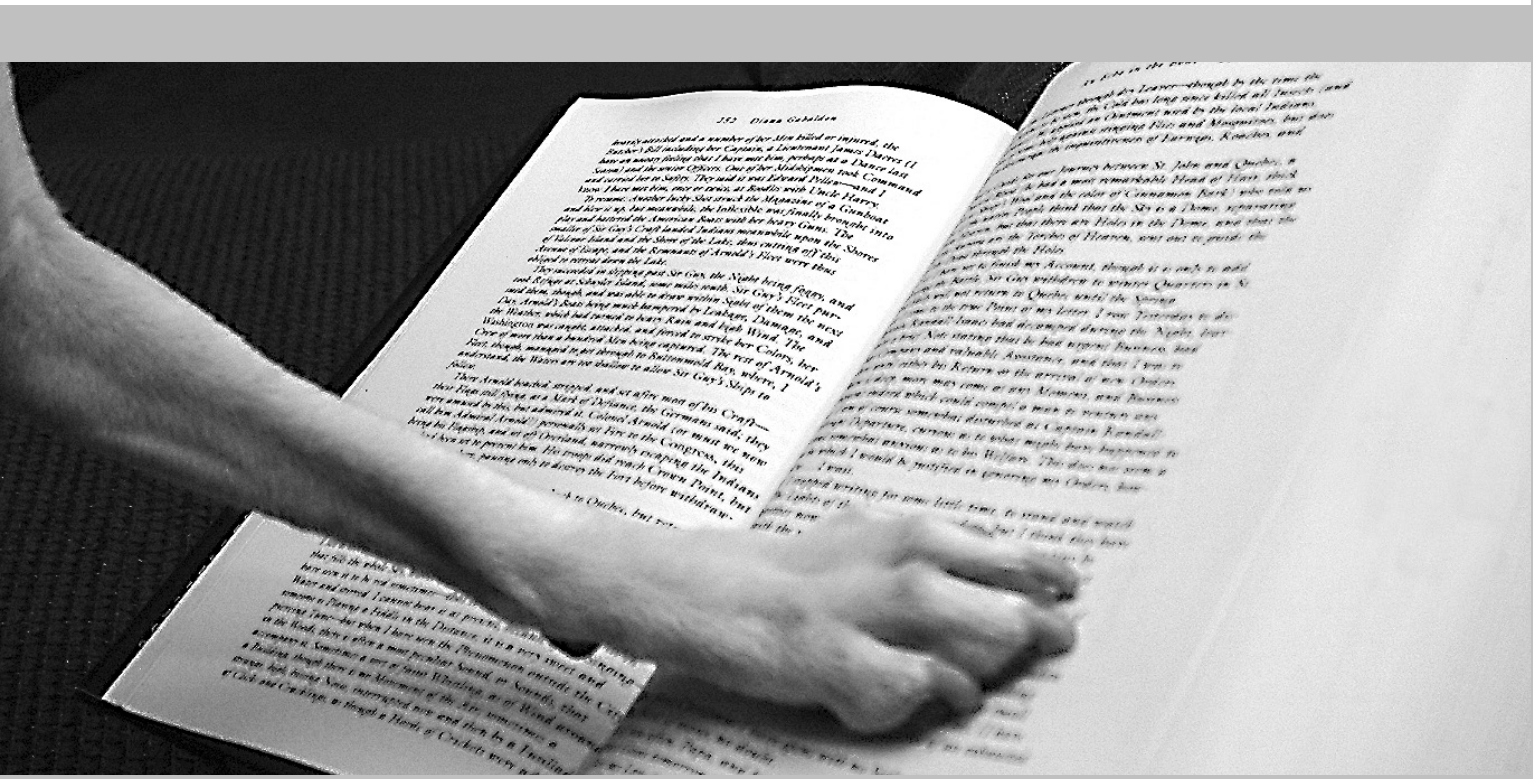
VI. CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

1. Todos los factores que predisponen a la infección por *Leishmania infantum* en el perro están directa o indirectamente relacionados con el tiempo de exposición al vector, es decir, con la permanencia a la intemperie.
2. Se constata el incremento de la prevalencia de la infección por *Leishmania infantum* a pesar de la evidente implementación tanto en el manejo clínico de los animales enfermos como en la aplicación de medidas preventivas frente a la picadura de estos dípteros vectores. Asimismo se ha evidenciado un incremento de las densidades de *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*.
3. Se confirma el carácter ubicuista de *Phlebotomus perniciosus*, principal vector de *Leishmania infantum* en la Comunidad de Madrid, en contraposición con *Phlebotomus ariasi* que se desarrolla en condiciones medioambientales más restringidas asociadas a zonas de montaña.
4. Se pone de manifiesto la importancia y validez de las variables medioambientales y meteorológicas en la construcción de modelos de predicción geográfica del flebotomo vector. La elaboración de mapas predictivos de abundancia y presencia de las especies de flebotominos vectores en la Comunidad de Madrid permitirán localizar las zonas que precisen de una actuación prioritaria en la lucha antivectorial.
5. La densidad aparente estimada de *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* podría ser utilizada como un indicador del riesgo de aparición de la infección por *Leishmania infantum* en un área determinada.
6. El pronóstico de la dispersión de *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* a lo largo del siglo XXI, bajo la premisa del futuro cambio climático, podría estar asociado a un incremento del riesgo de expansión de la infección por *Leishmania infantum* en la Comunidad de Madrid.

VII. BIBLIOGRAFÍA



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abranches P, Conceicao Silva FM, Ribeiro MM, Lopes FJ y Gomes LT, 1983, Kala-azar in Portugal--IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77, 420-421.
- Abranches P, Conceicao-Silva FM y Silva-Pereira MC, 1984, Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *J Trop Med Hyg*, 87, 197-200.
- Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM y Janz JG, 1991, Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, 77, 557-561.
- Acedo Sánchez C, Martín Sánchez J, Velez Bernal ID, Sanchís Marín MC, Louassini M, Maldonado JA y Morillas Márquez F, 1996, Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int J Parasitol*, 26, 303-310.
- Adamama-Moraitou KK, Rallis TS, Koytinas AF, Tontis D, Plevraki K y Kritsepi M, 2007, Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 53-57.
- Agut A, Corzo N, Murciano J, Laredo FG y Soler M, 2003, Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet Rec*, 153, 648-652.
- Aisa MJ, Riera C, Fisa R, Miquel J, Portús M y Gállego M, 1991. El zorro como posible reservorio de *Leishmania* en el noroeste Ibérico. En: Resúmenes del I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología (ICASEP), Valencia, p. 363.
- Ait-Oudhia K, Lami P, Lesceu S, Harrat Z, Hamrioui B, Dedet JP y Pratlong F, 2009, Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Ann Trop Med Parasitol*, 103, 679-692.
- Alam MS, Wagatsuma Y, Mondal D, Khanum H y Haque R, 2009, Relationship between sand fly fauna and kala-azar endemicity in Bangladesh. *Acta Trop*, 112, 23-25.
- Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H y Pereira MH, 2002, Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8, 1480-1485.
- Alexander B y Maroli M, 2003, Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*, 17, 1-18.
- Alexander B, Barros VC, de Souza SF, Barros SS, Teodoro LP, Soares ZR, Gontijo NF y Reithinger R, 2009, Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Trop Med Int Health*, 14, 1272-1277.
- Alexandre-Pires G, Pais D, Correia M y Pina JA, 2006, Leishmaniosis--a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res Tech*, 69, 227-235.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME y Atta AM, 2005, Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*, 127, 227-232.
- Alonso F, Giménez Font P, Manchón M, Ruiz de Ybañez R, Segovia M y Berriatua E, 2009, Geographical Variation and Factors Associated to Seroprevalence of Canine Leishmaniosis in an Endemic Mediterranean Area. *Zoonoses Public Health*, en prensa.
- Alvar J, Gutiérrez-Solar B, Aguilar A, Castillo JA y Lucientes J, 1990. Análisis del DNA de *L. infantum*. Caracterización de aislados de diferentes mamíferos. En: Resúmenes del Congreso de Zoonosis, 1^{er} Interautonómico Español, Valencia, pp. 231-232.
- Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J, Rodríguez F y col., 1994, Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*, 88, 371-378.

- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R y 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 y Nieto J, 2004, Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 57, 1-88.
- Alvar J, Yactayo S y Bern C, 2006, Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, 22, 552-557.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R y Moreno J, 2008, The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 21, 334-359.
- Amalraj DD, Sivagnaname N y Srinivasan R, 1999, Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) to insecticides. *J Commun Dis*, 31, 177-180.
- Amela C, Méndez I, Torcal JM, Medina G, Pachón I, Cañavate C y Alvar J, 1995, Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol*, 11, 157-161.
- Amusátegui I, Sainz A, Rodríguez F y Tesouro MA, 2003, Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol*, 18, 147-156.
- Amusátegui I, Sainz A, Aguirre E y Tesouro MA, 2004, Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci*, 1026, 154-157.
- Andrade HM, de Toledo Vde P, Marques MJ, Franca Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W y Genaro O, 2002, *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet Parasitol*, 103, 71-81.
- Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Pérez LE y Melby PC, 2001, Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun*, 69, 4709-4718.
- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R y Corbellino M, 2008, Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis*, 8, 191-199.
- Antoniou M, Messaritakis I, Christodoulou V, Ascoksilaki I, Kanavakis N, Sutton AJ, Carson C y Courtenay O, 2009, Increasing incidence of zoonotic visceral leishmaniasis on Crete, Greece. *Emerg Infect Dis*, 15, 932-934.
- Aransay AM, Testa JM, Morillas-Márquez F, Lucientes J y Ready PD, 2004, Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol Res*, 94, 416-420.
- Arnedo Pena A, Bellido Blasco JB, González Morán F, Arias Sánchez A, Calvo Mas C, Safont Adsuara L, Fabra Peirat E, Criado Juárez J y Pons Roig P, 1994, Leishmaniasis en Castellón: estudio epidemiológico de los casos humanos, vector y reservorio canino. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)*, 68, 481-491.
- Ashford RW, 2000, The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, 30, 1269-1281.
- Aspöck H, Gerersdorfer T, Formayer H, Walochnik J, 2008, Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wien Klin Wochenschr*, 120, 24-29.
- Ayllon T, Tesouro MA, Amusátegui I, Villaescusa A, Rodríguez-Franco F y Sainz A, 2008, Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann N Y Acad Sci*, 1149, 361-364.
- Bacot A y Martin C, 1914, Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. *J Hygiene Plague*, Suppl III, 423-439.
- Baneth G y Shaw SE, 2002, Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 106, 315-324.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P y Ferrer L, 2008, Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, 24, 324-330.

- Bashaye S, Nombela N, Argaw D, Mulugeta A, Herrero M, Nieto J, Chicharro C, Cañavate C, Aparicio P, Vélez ID, Alvar J y Bern C, 2009, Risk factors for visceral leishmaniasis in a new epidemic site in Amhara Region, Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg*, 81, 34-39.
- Bates PA, 2007, Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37, 1097-1106.
- Bavia ME, Carneiro DD, Gurgel Hda C, Madureira Filho C y Barbosa MG, 2005, Remote Sensing and Geographic Information Systems and risk of American visceral leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Parassitologia*, 47, 165-169.
- Beck LR, Lobitz BM y Wood BL, 2000, Remote sensing and human health: new sensors and new opportunities. *Emerg Infect Dis*, 6, 217-227.
- BECM, 1999, Búsqueda retrospectiva de casos de leishmaniosis humana en la Comunidad de Madrid (Periodo 1991-1996). *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid*, 6, 20 pp.
- BECM, 2005, Zoonosis. Comunidad de Madrid, años 2002 - 2004. *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid*, 11, 47-77.
- Ben-Ahmed K, Aoun K, Jeddi F, Ghrab J, El-Aroui MA y Bouratbine A, 2009, Visceral leishmaniasis in Tunisia: spatial distribution and association with climatic factors. *Am J Trop Med Hyg*, 81, 40-45.
- Benito-De Martín MI, Lucientes-Curdi J, Orcajo-Teresa J y Castillo-Hernández JA, 1991, Seasonal dynamics of *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) populations in Aragon (N.E. Spain). *Parassitologia*, 33 Suppl, 89-97.
- Bern C, Maguire JH y Alvar J, 2008, Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2, e313.
- Bettini S, Pozio E y Gradoni L, 1980, Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (II) *Leishmania* form wild *Bodentia* and *Carnivora* in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74, 77-83.
- Bhattarai NR, Van der Auwera G, Rijal S, Picado A, Speybroeck N, Khanal B, De Doncker S, Das ML, Ostyn B, Davies C, Coosemans M, Berkvens D, Boelaert M y Dujardin JC, 2010, Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. *Emerg Infect Dis*, 16, 231-237.
- Birkenheuer AJ, Correa MT, Levy MG y Breitschwerdt EB, 2005, Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). *J Am Vet Med Assoc*, 227, 942-947.
- Bladé I, Cacho I, Castro-Díez Y, Gomis D, González-Sampériz P, Miguez-Macho G, Perez Fiz F, Rodríguez-Fonseca B, Rodríguez-Puebla C, Sánchez E, Sotillo Marcos G, Valero-Garcés B y Vargas-Yáñez M, 2010, Clima en España: pasado, presente y futuro. Informe de evaluación del cambio climático regional. Red Temática CLIVAR-España, 83 pp.
- Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadore JL y Bourdoiseau G, 2001, Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J*, 162, 108-120.
- Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M y Palatnik de Sousa CB, 2002, Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20, 3277-3284.
- Borja-Cabrera GP, Cruz Mendes A, Paraguai de Souza E, Hashimoto Okada LY, de ATFA, Kawasaki JK, Costa AC, Reis AB, Genaro O, Batista LM, Palatnik M y Palatnik-de-Sousa CB, 2004, Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, 22, 2234-2243.
- Borja-Cabrera GP, Santos FN, Bauer FS, Parra LE, Menz I, Morgado AA, Soares IS, Batista LM y Palatnik-de-Sousa CB, 2008, Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, 26, 4991-4997.

- Borja-Cabrera GP, Santos FN, Santos FB, Trivellato FA, Kawasaki JK, Costa AC, Castro T, Nogueira FS, Moreira MA, Luvizotto MC, Palatnik M y Palatnik-de-Sousa CB, 2010, Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 28, 597-603.
- Botet J, Gállego M y Portús M, 1989. Estudio preliminar sobre la distribución y fenología de los flebotomos en Barcelona. En: Resúmenes del I Congreso Ibérico de Parasitología/ VI Congreso Nacional de Parasitología, Cáceres, p. 200.
- Brazil RP y Oliveira SM, 1999, Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Med Vet Entomol*, 13, 463-464.
- Brodie TM, Smith MC, Morris RV y Titus RG, 2007, Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun*, 75, 2359-2365.
- Brooker S y Utzinger J, 2007, Integrated disease mapping in a polyparasitic world. *Geospat Health*, 1, 141-146.
- 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 y Torres L, 2008, Generación de escenarios regionalizados de cambio climático para España. Technical report, Agencia Estatal de Meteorología (AEMET), Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 158 pp.
- Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H y Alexander J, 1998, The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 76, 173-180.
- Cárdenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales AJ y Franco-Paredes C, 2006, Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 75, 273-277.
- Cárdenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales AJ y Vivas P, 2008, Zoonoses and climate variability. *Ann N Y Acad Sci*, 1149, 326-330.
- Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M y Cabral M, 1998, Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol*, 79, 213-220.
- Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N y Rodrigues M, 2004, Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop*, 91, 95-100.
- Carneiro DD, Bavia ME, Rocha WJ, Tavares AC, Cardim LL y Alemayehu B, 2007, Application of spatio-temporal scan statistics for the detection of areas with increased risk for American visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Geospat Health*, 2, 113-126.
- Castañeda R, Carpio I, Asensio A, Alberdi JC, García S, Domínguez T y Moreno S, 1999, Estudio de seroprevalencia de la leishmaniasis canina en perros censados en Madrid. *Consulta de difusión veterinaria*, 7, 836-841.
- Castillejo S, 2007. Factores que influyen en la incidencia de la leishmaniasis canina a través de un estudio epidemiológico longitudinal en el foco de la comarca del Priorato (Tarragona). Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, 329 pp.
- Castillo Hernández JA, Sánchez Acedo C, Gutiérrez Galindo J, Lucientes Curdi J, Estrada Peña A y Galmes Femeninas M, 1985. Evaluación de diversas pruebas en el diagnóstico de la leishmaniasis canina. En: IV Congreso Nacional de Parasitología, Tenerife, p. 31.
- Cavalier-Smith T, 1998, A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 73, 203-266.
- Celaya C, 1993, Estudio epidemiológico descriptivo de la leishmaniasis canina en un entorno periurbano de la ciudad de Madrid. *Veterinaria en Madrid*, 5, 13-15.
- Cerbino Neto J, Werneck GL y Costa CH, 2009, Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad Saude Publica*, 25, 1543-1551.

- Chamaille L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P y Dedet JP, 2010, Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasit Vectors*, 3, 31.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J y Boelaert M, 2007, Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, 5, 873-882.
- Chargui N, Haouas N, Gorcii M, Akrouit Messaidi F, Zribi M y Babba H, 2007, Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite*, 14, 247-251.
- Chelbi I, Kaabi B, Bejaoui M, Derbali M y Zhioua E, 2009, Spatial correlation between *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae) and incidence of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *J Med Entomol*, 46, 400-402.
- Chicharro C, Nieto J, García E, Cruz I, Cañavate C, Flores M, Cuadrado J y Alvar J, 2004. Epidemiology of canine leishmaniasis in Ibiza (Balearic Islands): comparative study of different diagnosis methods. En: EMOP IX, Valencia, Spain, p. 161.
- Chicharro C, Nieto J, Moreno J, Carrillo E, Cruz I, Flores M, Aransay A, Molina R, García E, Bailo B, Cuadrado J, Cañavate C y Alvar J, 2005. Canine leishmaniasis in Ibizian Hound. A resistant dog breed? En: Worldleish 3, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy, p. 129.
- Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A y Persechino A, 1997, A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, 141, 539-543.
- Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L y Persechino A, 2005, Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J*, 169, 465-467.
- Claborn D, Masuoka P, Morrow M y Keep L, 2008, Habitat analysis of North American sand flies near veterans returning from *Leishmania*-endemic war zones. *Int J Health Geogr*, 7, 65.
- Colacicco-Mayhugh MG, Masuoka PM y Grieco JP, 2010, Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the Middle East. *Int J Health Geogr*, 9, 2.
- Coleman RE, Burkett DA, Sherwood V, Caci J, Spradling S, Jennings BT, Rowton E, Gilmore W, Blount K, White CE y Putnam JL, 2007, Impact of phlebotomine sand flies on U.S. Military operations at Tallil Air Base, Iraq: 2. Temporal and geographic distribution of sand flies. *J Med Entomol*, 44, 29-41.
- Conesa Gallego E, 1994. Los flebotomos (Diptera:Psychodidae) de la Comunidad de Madrid. Implicaciones epidemiológicas. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, Murcia, 381 pp.
- Convit J, Castellanos PL, Rondón A, Pinaridi ME, Ulrich M, Castes M, Bloom B y García L, 1987, Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet*, 1, 401-405.
- Correa Antonialli SA, Torres TG, Paranhos Filho AC y Tolezano JE, 2007, Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *J Infect*, 54, 509-514.
- Cortes S, Afonso MO, Alves-Pires C y Campino L, 2007, Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 13, 1431-1432.
- Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Senhorini IL, Silva TC y Guerra JL, 2003, Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol*, 40, 677-684.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ y Dye C, 2002, Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*, 186, 1314-1320.
- Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De María M, Genaro O y Linardi PM, 2005, Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 128, 149-155.

- Coutinho MT y Linardi PM, 2007, Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol*, 147, 320-325.
- Couto CG, Lorentzen L, Beall MJ, Shields J, Bertolone N, Couto JI, Couto KM, Nash S, Slack J, Kvitko H, Westendorf N, Marín L, Lazbik MC, Vicario FC, Sanz P y Ruano R, 2010, Serological Study of Selected Vector-Borne Diseases in Shelter Dogs in Central Spain Using Point-of-Care Assays. *Vector Borne Zoonotic Dis*, en prensa.
- Criado-Fornelio A, Gutiérrez-García L, Rodríguez-Cabeiro F, Reus-García E, Roldán-Soriano MA y Díaz-Sánchez MA, 2000, A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol*, 92, 245-251.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V y Musella V, 2005, Disease mapping and risk assessment in veterinary parasitology: some case studies. *Parassitologia*, 47, 9-25.
- Cross ER y Hyams KC, 1996, The potential effect of global warming on the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Environ Health Perspect*, 104, 724-727.
- Cross ER, Newcomb WW y Tucker CJ, 1996, Use of weather data and remote sensing to predict the geographic and seasonal distribution of *Phlebotomus papatasi* in southwest Asia. *Am J Trop Med Hyg*, 54, 530-536.
- Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A y Alvar J, 2002a, *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, 359, 1124-1125.
- Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S y Alvar J, 2002b, A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96 Suppl 1, S185-189.
- da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, Williams P y Melo MN, 2007, Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, 174, 636-643.
- da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, de Souza EP, Luz KG, Palatnik M y Palatnik de Sousa CB, 2000, A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, 19, 1082-1092.
- Daba S, Mansour NS, Youssef FG, Shanbaky NM, Shehata MG y el Sawaf BM, 1997a, Vector-host-parasite inter-relationships in leishmaniasis. II. Influence of blood meal from natural vertebrate hosts with and without *Leishmania infantum* and *L. major* on the proteolytic activity in the gut of *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *J Egypt Soc Parasitol*, 27, 639-649.
- Daba S, Mansour NS, Youssef FG, Shanbaky NM, Shehata MG y el Sawaf BM, 1997b, Vector-host-parasite inter-relationships in leishmaniasis. III. Impact of blood meal from natural vertebrate hosts on the survival and the development of *Leishmania infantum* and *L. major* in *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *J Egypt Soc Parasitol*, 27, 781-794.
- Dantas-Torres F, 2006, *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101, 117-118.
- Dantas-Torres F y Brandao-Filho SP, 2006, Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 48, 151-156.
- Dantas-Torres F, 2007, The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*, 149, 139-146.
- Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandao-Filho SP, Alves LC y Otranto D, 2010, Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res*, 106, 857-860.

- David JR, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick-Kendrick R y Lima JW, 2001, Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96, 839-847.
- Davies CR, Kaye P, Croft SL y Sundar S, 2003, Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Bmj*, 326, 377-382.
- de Castro M, Martín-Vide J y Alonso S, 2005, El clima de España: pasado, presente y escenarios de clima para el siglo XXI, En: Evaluación preliminar de los impactos en España por efecto del cambio climático. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España, 62 pp.
- de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP y Michalick MS, 2006, Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*, 137, 159-167.
- de la Loma A, Alvar J, Martínez Galiano E, Blázquez J, Alcalá Muñoz A y Nájera R, 1985, Leishmaniasis or AIDS? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79, 421-422.
- de Lima VM, Ikeda FA, Rossi CN, Feitosa MM, Vasconcelos RO, Nunes CM y Goto H, 2010, Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 135, 296-302.
- de Oliveira Mendes C, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Maria Melo Batista L, Aparecida dos Santos M, Ellner Parra L, Menz I, Palatnik M y Palatnik de Sousa CB, 2003, IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 21, 2589-2597.
- Denerolle P y Bourdoiseau G, 1999, Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*, 13, 413-415.
- Depaquit J, Naucke TJ, Schmitt C, Ferte H y Leger N, 2005, A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* Artemiev, 1984 (*Phlebotomus*, Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. *Parasitol Res*, 95, 113-116.
- Dereure J, Rioux JA, Gállego M, Perieres J, Pratlong F, Mahjour J y Saddiki H, 1991, *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85, 595.
- Dereure J, Vanwambeke SO, Male P, Martínez S, Pratlong F, Balard Y y Dedet JP, 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.
- Desjeux P, 1996, Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, 14, 417-423.
- Desjeux P, 2004, Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 305-318.
- Diakou A, Papadopoulos E y Lazarides K, 2009, Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg*, 11, 728-730.
- Dietze R, Falqueto A, Valli LC, Rodrigues TP, Boulos M y Corey R, 1995, Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*, 53, 40-42.
- Dipineto L, Manna L, Baiano A, Gala M, Fioretti A, Gravino AE y Menna LF, 2007, Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *J Wildl Dis*, 43, 518-520.
- Doha S y Shehata MG, 1992, *Leishmania infantum* MON-98 isolated from naturally infected *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae) in El Agamy, Egypt. *J Med Entomol*, 29, 891-893.
- Dos-Santos WL, David J, Badaro R y de-Freitas LA, 2004, Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, 92, 89-94.

- Dos-Santos WL, Jesus EE, Paranhos-Silva M, Pereira AM, Santos JC, Baleeiro CO, Nascimento EG, Moreira ED, Oliveira GG y Pontes-de-Carvalho LC, 2008, Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, 123, 251-259.
- Dougherty MJ, Hamilton JG y Ward RD, 1994, Isolation of oviposition pheromone from the eggs of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med Vet Entomol*, 8, 119-124.
- Dufour B, Moutou F, Hattenberger AM y Rodhain F, 2008, Global change: impact, management, risk approach and health measures--the case of Europe. *Rev Sci Tech*, 27, 529-550.
- Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbel Y y Boelaert M, 2008, Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14, 1013-1018.
- Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED y Schantz PM, 2006, Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*, 12, 440-446.
- Dye C, Guy MW, Elkins DB, Wilkes TJ y Killick-Kendrick R, 1987, The life expectancy of phlebotomine sandflies: first field estimates from southern France. *Med Vet Entomol*, 1, 417-425.
- Dye C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Killick-Kendrick M, Harith AE, Guy MW, Cañavate MC y Hasibeder G, 1992, Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology*, 105 35-41.
- El-Badry A, Al-Juhani A, Ibrahim el K y Al-Zubiany S, 2008, Distribution of sand flies in El-Nekheil province, in Al-Madinah Al-Munawwarah region, western of Saudi Arabia. *Parasitol Res*, 103, 151-156.
- Elnaiem DA, Connor SJ, Thomson MC, Hassan MM, Hassan HK, About MA y Ashford RW, 1998, Environmental determinants of the distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan. *Ann Trop Med Parasitol*, 92, 877-887.
- Elnaiem DE y Ward RD, 1991, Response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to an oviposition pheromone associated with conspecific eggs. *Med Vet Entomol*, 5, 87-91.
- Elnaiem DE, Schorscher J, Bendall A, Obsomer V, Osman ME, Mekkawi AM, Connor SJ, Ashford RW y Thomson MC, 2003, Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern Sudan. *Am J Trop Med Hyg*, 68, 10-17.
- Encinas Grandes A, Gómez-Bautista M, Martín Novo M y Simón Martín F, 1988, Leishmaniasis in the province of Salamanca, Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. *Ann Parasitol Hum Comp*, 63, 387-397.
- Enserink M, 2000, Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science*, 290, 1881-1883.
- Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Bardagi M, Alberola J, Ramis A y Ferrer L, 2006, Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol*, 135, 181-185.
- Fernández MS, Salomón OD, Cavia R, Pérez AA, Acardi SA y Guccione JD, 2010, *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Trop*, 114, 81-87.
- Ferreira AL, Sessa PA, Varejao JB y Falqueto A, 2001, 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*, 96, 1061-1067.
- Ferreira MG, Fattori KR, Souza F y Lima VM, 2009, Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol*, 165, 150-154.

- Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN y de Andrade AS, 2008, Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, 152, 257-263.
- Ferrer L, Juanola B, Ramos JA y Ramis A, 1991, Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol*, 28, 342-343.
- Ferrer L, 1999. Clinical aspect of canine leishmaniasis. En: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniosis Forum Barcelona, pp. 6-10.
- Ferro C, Pardo R, Torres M y Morrison AC, 1997, Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol*, 34, 719-728.
- Ferroglio E, Poggi M y Trisciuglio A, 2008, Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health*, 55, 145-148.
- Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J y Portús M, 1999, Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol*, 83, 87-97.
- Foglia Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M y Gradoni L, 2006, Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet Parasitol*, 142, 142-145.
- Fondevila D, Vilafranca M y Ferrer L, 1997, Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 56, 319-327.
- Font A, Ginés C, Closa JM y Mascort J, 1994, Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 204, 1043-1044.
- Font A, Roura X, Fondevila D, Closa JM, Mascort J y Ferrer L, 1996, Canine mucosal leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc*, 32, 131-137.
- Fraile González R, 1983. Flebotominae de la Region Central. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 162 pp.
- Franca-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O y Nascimento E, 2003, Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, 111, 161-173.
- Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A y Roura X, 2006, Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 137, 214-221.
- Franke CR, Ziller M, Staubach C y Latif M, 2002, Impact of the El Niño/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8, 914-917.
- Freier JE y FitzMaurice PL, 1998, Use of geographical information system in mosquito control. *Wing Beats of the Florida Mosquito Control association*, 9, 8-18.
- Fujiwara RT, Vale AM, Franca da Silva JC, da Costa RT, Quetz Jda S, Martins Filho OA, Reis AB, Correa Oliveira R, Machado-Coelho GL, Bueno LL, Bethony JM, Frank G, Nascimento E, Genaro O, Mayrink W, Reed S y Campos-Neto A, 2005, Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LelF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*, 36, 827-838.
- Gaeta GB, Gradoni L, Gramiccia M, di Martino L, Pizzuti R, Pempinello R, Scotti S y Maisto A, 1994, [Visceral leishmaniasis in Italy. Its epidemiology, clinical picture and therapy]. *Recenti Prog Med*, 85, 340-347.
- Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ y Hayes EB, 2008, Climate and vectorborne diseases. *Am J Prev Med*, 35, 436-450.

- Gálvez R, 2001. Evaluación de las actividades repelente e indecticida sobre *Phlebotomus perniciosus* de una solución pulverizable compuesta de permetrín y piriproxifeno. Tesina de Licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 77 pp.
- Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E y Molina R, 2010a, Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol*, 169, 327-334.
- Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, Martín O, Dos Santos-Brandao F, Guerrero I, Cubero E y Molina R, 2010b, Seasonal trends and spatial relations between environmental/ meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop*, 115, 95-102.
- Gállego M, Rioux JA, Rispail P, Guilvard E, Gállego J, Portús M, Delalbre A, Bastien P, Martínez-Ortega E y Fisa R, 1990, Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Revista Ibérica de Parasitología*, 50, 123-127.
- Gállego M, Pratlong F, Fisa R, Riera C, Rioux JA, Dedet JP y Portús M, 2001, 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*, 95, 269-271.
- García-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C y Navarrete I, 1996a, Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol*, 18, 539-546.
- García-Alonso M, Blanco A, Reina D, Serrano FJ, Alonso C y Nieto CG, 1996b, Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 18, 617-623.
- Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A y Breitschwerdt EB, 2002, Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med*, 16, 34-44.
- Gavvani AS, Hodjati MH, Mohite H y Davies CR, 2002, Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*, 360, 374-379.
- Gebre-Michael T, Malone JB, Balkew M, Ali A, Berhe N, Hailu A y Herzi AA, 2004, Mapping the potential distribution of *Phlebotomus martini* and *P. orientalis* (Diptera: Psychodidae), vectors of kala-azar in East Africa by use of geographic information systems. *Acta Trop*, 90, 73-86.
- Ghosh K, Mukhopadhyay J, Desai MM, Senroy S y Bhattacharya A, 1999, Population ecology of *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) in West Bengal, India. *J Med Entomol*, 36, 588-594.
- Ginel PJ, Lucena R, López R y Molleda JM, 1998, Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 39, 271-274.
- Githeko AK, Lindsay SW, Confalonieri UE y Patz JA, 2000, Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ*, 78, 1136-1147.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL y Reis AB, 2006, Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol*, 135, 100-107.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL y Reis AB, 2008a, Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 84, 269-277.

- Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Coura-Vital W, de Abreu RT, Malaquias LC, Gontijo NF, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa DJ, de Lana M y Reis AB, 2008b, A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*, 26, 623-638.
- González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, Sánchez-Cordero V y Sarkar S, 2010, Climate change and risk of leishmaniasis in North America: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e585.
- Gossage SM, Rogers ME y Bates PA, 2003, Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol*, 33, 1027-1034.
- Goto Hy Prianti MG, 2009, Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 51, 241-246.
- Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M y Mancianti F, 1987, *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol*, 1, 339-342.
- Gradoni L, 1999, Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. En: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, pp. 32-39.
- Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantedosi D, De Luna R, Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T y Oliva G, 2005, Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, 23, 5245-5251.
- Gramiccia M y Gradoni L, 2005, The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*, 35, 1169-1180.
- Gramiccia M, Di Muccio T, Fiorentino E, Scalone A, Bongiorno G, Cappiello S, Paparcone R, Foglia Manzillo V, Maroli M, Gradoni L y Oliva G, 2010, Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. *Vet Parasitol*, en prensa.
- Green RM y Hay SI, 2002, The potential of Pathfinder AVHRR data for providing surrogate climatic variables across Africa and Europe for epidemiological applications. *Remote sensing of Environment*, 79, 166-175.
- Grimm F, Gessler M y Jenni L, 1993, Aspects of sandfly biology in southern Switzerland. *Med Vet Entomol*, 7, 170-176.
- Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Gracia MJ y Castillo JA, 2000a, Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop*, 77, 203-207.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribáñez MA, Alvar J y Castillo JA, 2000b, Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci*, 69, 249-253.
- Guernaoui S y Boumezzough A, 2009, Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco. *J Med Entomol*, 46, 1187-1194.
- Halbig P, Hodjati MH, Mazloumi-Gavvani AS, Mohite H y Davies CR, 2000, Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Med Vet Entomol*, 14, 223-226.
- Harms G, Schonian G y Feldmeier H, 2003, Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect Dis*, 9, 872-875.
- Hassan MM, Osman OF, El-Raba'a FM, Schallig HD y Elnaiem DE, 2009, Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasit Vectors*, 2, 26.

- Hay SI, Tucker CJ, Rogers DJ y Packer MJ, 1996, Remotely sensed surrogates of meteorological data for the study of the distribution and abundance of arthropod vectors of disease. *Ann Trop Med Parasitol*, 90, 1-19.
- Hay SI, Tatem AJ, Graham AJ, Goetz SJ y Rogers DJ, 2006, Global environmental data for mapping infectious disease distribution. *Adv Parasitol*, 62, 37-77.
- Hugh-Jones M, 1989, Applications of remote sensing to the identification of the habitats of parasites and disease vectors. *Parasitol Today*, 5, 244-251.
- IPCC, 2007, Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp.
- Jacob D, 2008, Short communication on regional climate change scenarios and their possible use for impact studies on vector-borne diseases. *Parasitol Res*, 103 Suppl 1, S3-6.
- Jones TM y Hamilton JGC, 1998, A role for pheromones in mate choice in a lekking sandfly. *Anim Behav*, 56, 891-898.
- Juttner C, Rodríguez Sánchez M, Rollán Landeras E, Slappendel RJ y Fragio Arnold C, 2001, Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Vet Rec*, 149, 176-179.
- Kalluri S, Gilruth P, Rogers D y Szczur M, 2007, Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS Pathog*, 3, 1361-1371.
- Kamhawi S, 2006, Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, 22, 439-445.
- Khanal B, Picado A, Bhattarai NR, G VDA, Das ML, Ostyn B, Davies CR, Boelaert M, Dujardin JC y Rijal S, 2010, Spatial analysis of *Leishmania donovani* exposure in humans and domestic animals in a recent kala azar focus in Nepal. *Parasitology*, 1-7.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH y Ashford RW, 1974, *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 187, 409-419.
- Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD y Molyneux DH, 1977, *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 196, 105-115.
- Killick-Kendrick R, 1983. Investigation of phlebotomine sandflies-vectors of leishmaniasis. En: Proceedings of the Indo-UK Workshop on Leishmaniasis, pp. 72-83.
- Killick-Kendrick R, Rioux JA, Bailly M, Guy MW, Wilkes TJ, Guy FM, Davidson I, Knechtli R, Ward RD, Guilvard E y y col., 1984, Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cevennes. *Ann Parasitol Hum Comp*, 59, 555-572.
- Killick-Kendrick R, 1985, Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 78, 747-755.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP y Cadiergues MC, 1997, Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, 11, 105-111.
- Killick-Kendrick R, 1999, The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*, 17, 279-289.
- King RJ, Campbell-Lendrum DH y Davies CR, 2004, Predicting geographic variation in cutaneous leishmaniasis, Colombia. *Emerg Infect Dis*, 10, 598-607.
- Kishore K, Kumar V, Kesari S, Dinesh DS, Kumar AJ, Das P y Bhattacharya SK, 2006, Vector control in leishmaniasis. *Indian J Med Res*, 123, 467-472.
- Kitron U, 2000, Risk maps: transmission and burden of vector-borne diseases. *Parasitol Today*, 16, 324-325.

- Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N y Papadopoulos O, 2001, A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 98, 247-261.
- Kuhn KG, 1999, Global warming and leishmaniasis in Italy. *Trop Med Int Health*, 7, 1-2.
- Lainson R y Rangel EF, 2005, *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100, 811-827.
- Lamothe J, 2001, Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 42, 170-175.
- Lanotte G, Rioux JA, Croset H y Vollhardt Y, 1978, [Ecology of leishmaniasis in southern France. 9. Sampling methods in the study and analysis of canine enzootic leishmaniasis]. *Ann Parasitol Hum Comp*, 53, 33-45.
- Lasri S, Sahibi H, Sadak A, Jaffe CL y Rhalem A, 1999, Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet Res*, 30, 441-449.
- Leite RS, Ferreira SD, Ituassu LT, de Melo MN y de Andrade AS, 2010, PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol*, 170, 201-206.
- Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra M, Goncalves RB, Hottin G y Papierok G, 2005, Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*, 23, 2825-2840.
- Lemesre JL, Holzmuller P, Goncalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M y Papierok G, 2007, Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, 25, 4223-4234.
- Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MA, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S y Dietze R, 2008, Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop*, 107, 205-207.
- Lemrani M, Nejjar R y Pratlong F, 2002, A new *Leishmania tropica* zymodeme--causative agent of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Ann Trop Med Parasitol*, 96, 637-638.
- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD y Mylonakis ME, 2002, A cross-sectional study of *Leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol*, 109, 19-27.
- Lepe JA, Ubeda JM, Morillas F, Guevara DC, Martín-Sánchez J, Guerrero FJ, Sanchos-Marín MC y Perea R, 2000, Epidemiology of leishmaniasis in the nature reserve of Sierra de Aracena and Picos de Aroche (Southwest Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, 60, 113-119.
- Lewis DJ, 1987, Depth of penetration of vertebrate skin by phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann Trop Med Parasitol*, 81, 173-179.
- Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W y Luiz Tafuri W, 2004, Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop*, 92, 43-53.
- Lobsiger L, Muller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B y Gottstein B, 2010, An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol*, 169, 408-414.
- López González GA, 2004, Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares (Especies silvestres y cultivadas más comunes), 2ª Edition. Mundi-Prensa Libros, S.A., Madrid, 894 pp.
- Lucientes Curdi J, 1986. Contribución al conocimiento de la leishmaniasis visceral canina en Zaragoza. Estudio biológico y ecológico de las poblaciones de los flebotomos vectores. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 449 pp.
- Lucientes-Curdi J, Benito-de-Martín MI, Castillo-Hernández JA y Orcajo-Teresa J, 1991, Seasonal dynamics of *Larrousius* species in Aragon (N.E. Spain). *Parassitologia*, 33 Suppl, 381-386.

- Lucientes J, Osacar JJ, Calvete C, Benito I y Castillo JA, 1994, Sobre la presencia de *Phlebotomus (Larroussius) langeroni* Nitzulescu, 1930 (Diptera:Psychodidae) en Aragón. *Revista Aragonesa de Entomología*, 4, 19-22.
- Lucientes J, Benito de Martín I, Ferrer-Dufol M, Osacar JJ, Calvete C, Peribañez MA, Gracia-Salinas MJ, Guarga JL y Castillo JA, 1995, *Phlebotomus (Larroussius) langeroni* (Diptera: Psychodidae) in the focus of visceral leishmaniasis of Zaragoza (Northeast of Spain). Epidemiological implications. *Research and Reviews in Parasitology*, 55, 263-264.
- Lucientes J, 1999. Laboratory observations on the protection of dogs from the bites of *Phlebotomus perniciosus* with Scalibor® protector bands: preliminary results. En: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, pp. 92-94.
- Lucientes J, Palmero J, Guarga JL, Gracia MJ, Peribañez MA, Zárata J y Castillo JA, 2005, Risk of transmission of canine leishmaniasis in eastern Spain. *Vet Rec*, 156, 743-744.
- Llanos-Cuentas EA, Roncal N, Villaseca P, Paz L, Ogusuku E, Pérez JE, Cáceres A y Davies CR, 1999, Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93, 15-20.
- Maazoun R, Lanotte G, Pasteur N, Rioux JA, Kennou MF y Pratlong F, 1981, [Ecology of leishmaniasis in southern France. 16. Contribution to the chemotaxonomy of parasites of Mediterranean visceral leishmaniasis. Apropos of 55 strains isolated in the Cevennes, Cote d'Azur, Corsica and Tunisia]. *Ann Parasitol Hum Comp*, 56, 131-146.
- Machado-Coelho GL, Assuncao R, Mayrink W y Caiaffa WT, 1999, American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. *Int J Epidemiol*, 28, 982-989.
- Madeira Mde F, Schubach Ade O, Schubach TM, Serra CM, Pereira SA, Figueiredo FB, Confort EM, Quintella LP y Marzochi MC, 2005, Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol Res*, 97, 73-76.
- Maia C, Nunes M y Campino L, 2008, Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8, 555-559.
- Maia C, Ramada J, Cristovao JM, Goncalves L y Campino L, 2009a, Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J*, 179, 142-144.
- Maia C, Gomes J, Cristovao J, Nunes M, Martins A, Rebelo E y Campino L, 2009b. *Leishmania* survey on cats from a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. En: *Worldleish 4*, Lucknow, India, p. 267.
- Makni S, Ayed K, Ben Said M y Ben Rachid MS, 1989, Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 83, 349-355.
- Mancianti F, Mignone W y Galastri F, 1994, Serologic survey for leishmaniasis in free-living red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *J Wildl Dis*, 30, 454-456.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N y Gravino AE, 2004, Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 125, 251-262.
- Manna L, Gravino AE, Picillo E, Decaro N y Buonavoglia C, 2008, *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann N Y Acad Sci*, 1149, 358-360.
- Manna L, Reale S, Vitale F y Gravino AE, 2009, Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci*, 87, 76-78.
- Maresca C, Scoccia E, Barizzone F, Catalano A, Mancini S, Pagliacci T, Porrini M, Principato M, Venditti G y Grelloni V, 2009, A survey on canine leishmaniasis and phlebotomine sand flies in central Italy. *Res Vet Sci*, 87, 36-38.
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura AC, Timbo M, Gripp AH, Pessanha JE y Dias ES, 2006, Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101, 31-38.

- Marín Iniesta F, Marín Iniesta E y Martín Luengo F, 1982, Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la Región Murciana. Resultados preliminares. *Revista Ibérica de Parasitología*, 42, 307-313.
- Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'Oorazi A y Gradoni L, 2001, 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*, 15, 358-363.
- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L y Gramiccia M, 2007, Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 145, 357-360.
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglia E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M y 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.
- Maroli M, Jalouk L, Al Ahmed M, Bianchi R, Bongiorno G, Khoury C y Gradoni L, 2009, Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria. *Med Vet Entomol*, 23, 148-154.
- Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O y Morillas-Márquez F, 2007, Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol*, 145, 267-273.
- Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V y Morillas-Márquez F, 2009, Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis*, 15, 795-798.
- Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Gómez F y Hernández-Rodríguez S, 1990, Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba. *Revista Ibérica de Parasitología*, 50, 1-7.
- Martínez Ortega E, 1986. Los flebotomos (Diptera, Psychodidae) del Sureste de la Península Ibérica. Tesis doctoral. Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, 258 pp.
- Martínez Ortega E y Conesa Gallego E, 1987, Fenología de los flebotomos del subgénero *Larroussius* (*Dip. Psychodidae, Phlebotomus*) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín Asoc esp Entom*, 11, 293-300.
- Martínez-Ortega E, Conesa-Gallego E, Goyena-Salgado M y Romera-Lozano H, 1992, Presencia de *Phlebotomus* (*Larroussius*) *langeroni*, Nitzulescu, 1930 (Diptera, Psychodidae), en la Península Ibérica. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia*, 139, 196.
- Mateo M, 2007. Estudio sobre la eficacia comparada y la tolerancia de la miltefoxina y el antimonio de n-metilglucamina, y la monitorización post tratamiento con alopurinol en la infección natural por *Leishmania infantum* en el perro. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 281 pp.
- Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P y Miró G, 2009, Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol Res*, 105, 155-162.
- Mauricio IL, Stothard JR y Miles MA, 2000, The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, 16, 188-189.
- Mayrink W, Genaro O, Silva JC, da Costa RT, Tafuri WL, Toledo VP, da Silva AR, Reis AB, Williams P y da Costa PW, 1996, Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91, 695-697.
- Mayrink W, Botelho AC, Magalhaes PA, Batista SM, Lima Ade O, Genaro O, Costa CA, Melo MN, Michalick MS, Williams P, Dias M, Caiaffa WT, Nascimento E y Machado-Coelho GL, 2006, Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop*, 39, 14-21.

- Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, Tsatsaris A, Moschandreas J, Messaritakis I, Christodoulou V, Papadopoulos B, Ivovic V, Pratlong F, Loucaides F y Antoniou M, 2010, Leishmaniasis and the Cyprus Paradox. *Am J Trop Med Hyg*, 82, 441-448.
- Mencke N, Volf P, Volfova V y Stanneck D, 2003, Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitol Res*, 90 Suppl 3, S108-111.
- Mencke N, Volf P, Volfova V, Stanneck D, Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A y Molina R, 2005. Repellent efficacy of an imidacloprid/permethrin spot-on against sandflies (*Phlebotomus papatasi*, *P. perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis*). En: Proceedings of the Eighth International Symposium on Ectoparasite Pets, Hannover, Germany, p. 61.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H y Deplazes P, 2005, Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol*, 43, 5515-5519.
- Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, Franca-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL y Dias ES, 2007, Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol*, 147, 67-76.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Franca-Silva JC, Rocha MF, Barata RA y Dias ES, 2009, Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 1191-1193.
- Miranda C, Massa JL y Marques CC, 1996, [Occurrence of American cutaneous leishmaniasis by remote sensing satellite imagery in an urban area of Southeastern Brazil]. *Rev Saude Publica*, 30, 433-437.
- Miranda C, Marques CC y Massa JL, 1998, [Satellite remote sensing as a tool for the analysis of the occurrence of American cutaneous leishmaniasis in an urban area of southeastern Brazil]. *Rev Saude Publica*, 32, 455-463.
- Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L y Ramis A, 2008, Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res Vet Sci*, 85, 35-38.
- Miró G y Molina R, 2006, Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España Bayer HealthCare Edition, 114 pp.
- Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA y Molina R, 2007a, Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol*, 143, 375-379.
- Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, García S, García A, Caballero MJ y Molina R, 2007b, A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res*, 101, 253-257.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G y Baneth G, 2008, Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*, 24, 371-377.
- Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C y Bianciardi P, 2009, Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*, 20, 397-404.
- Mohebbi M, Khamesipour A, Mobedi I, Zarei Z y Hashemi-Fesharki R, 2004, Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine*, 22, 4097-4100.

- Molano I, Alonso MG, Mirón C, Redondo E, Requena JM, Soto M, Nieto CG y Alonso C, 2003, A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 92, 1-13.
- Molina R, 1991, Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Research and Reviews in Parasitology*, 51, 87-89.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J y 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, Miró G y Fraile C, 2000. Canine leishmaniasis: conventional therapies influencing infectivity of dogs to sandflies. En: *New challenges in tropical medicine and parasitology*, Oxford, p. 22.
- Molina R, Lohse JM y Nieto J, 2001, Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet Ther*, 2, 261-267.
- Molina R, Gradoni L y Alvar J, 2003, HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*, 97 Suppl 1, 29-45.
- Molina R, Miró G, Gálvez R, Nieto J y Descalzo MA, 2006, Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet Rec*, 159, 206-209.
- Montoya-Lerma J, 1992, Autogeny in the neotropical sand fly *Lutzomyia lichi* (Diptera: Psychodidae) from Colombia. *J Med Entomol*, 29, 698-699.
- Montoya Matute A, Dado Ortiz D, Espinosa Góngora C, Manzano Chinchón M, Ramírez Rodríguez S, Fuentes Corripio I y Miró Corrales G, 2009, Prevalencia de los principales parásitos de interés zoonótico en gatos vagabundos de la Comunidad de Madrid, España. *Acta Parasitologica Portuguesa*, 16, 114-115.
- Moraes-Silva E, Rodrigues Antunes F, Silva Rodrigues M, da Silva Julião F, Gomes Dias-Lima A, Lemos-de-Sousa V, Costa de Alcantara A, Almeida Gomes Reis E, Nakatani M, Badaró R, Galvão Reis M, Pontes-de-Carvalho L y Roberto Franke C, 2006, Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. *Acta Trop*, 98, 176-182.
- Moreira ED, Jr., de Souza VM, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB y de Carvalho LP, 2003, Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 69, 393-397.
- Moreira ED, Jr., Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG y Pontes de Carvalho L, 2004, Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol*, 122, 245-252.
- Moreno J y Alvar J, 2002, Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 18, 399-405.
- Moreno J, Nieto J, Masina S, Cañavate C, Cruz I, Chicharro C, Carrillo E, Napp S, Reymond C, Kaye PM, Smith DF, Fasel N y Alvar J, 2007, Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*, 25, 5290-5300.
- Morillas Márquez F, 1982. Epidemiología de la leishmaniosis en la provincia de Granada: Estudio biométrico, sistemático y del ciclo anual de los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae). Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, 256 pp.
- Morillas Márquez F, Guevara Benítez DC, Ubeda Ontiveros JM y González Castro J, 1983, Fluctuations annuelles des populations de Phlebotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenada (Espagne). *Ann Parasitol Hum Comp*, 58, 625-632.
- Morillas F, Benavides, I., González, J., Reyes, A. y Valero, A., 1985, Découverte de *Leishmania* sp. dans le *Rattus rattus* de la province de Grènade (Espagne). *Ann Parasitol Hum Comp* 60, 768-770.

- Morillas Márquez F, Sanchís Marín MC, Martín Sánchez J y Acedo Sánchez C, 1991, On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the Province of Almeria in southeastern Spain. *Parassitologia*, 33 Suppl, 437-444.
- Morillas F, Sánchez Rabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C y Sanchís-Marín MC, 1996, Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga 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 y Maroli M, 2009, Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. *Geospat Health*, 4, 115-127.
- Munstermann L, 2005, Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae, En: Marquardt, W.C. (Ed.) *Biology of disease vectors*. Dana Dreibelbis, San Diego, California, USA, pp. 141-151.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR y Saravia NG, 2005, Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366, 1561-1577.
- Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C y Kontos VI, 2005, Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol*, 34, 243-247.
- Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X y Peña T, 2005, Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 133, 37-47.
- Naucke TJ y Schmitt C, 2004, Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? *Int J Med Microbiol*, 293 Suppl 37, 179-181.
- Naucke TJ, Menn B, Massberg D y Lorentz S, 2008, Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res*, 103 Suppl 1, S65-68.
- Nieto CG, Navarrete I, Habela M y Hernández-Rodríguez S, 1992a, Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 13, 173-178.
- Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F y Redondo E, 1992b, Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 45, 33-47.
- Nieto P, Malone JB y Bavia ME, 2006, Ecological niche modeling for visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, using genetic algorithm for rule-set prediction and growing degree day-water budget analysis. *Geospat Health*, 1, 115-126.
- Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE y Sacks DL, 2003, The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol*, 170, 5152-5158.
- Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, Xu Z, Chu HJ, Palatnik-de-Sousa CB y Luvizotto MC, 2005, Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, 23, 4805-4810.
- Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE y Burattini MN, 2008, Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*, 153, 19-23.
- Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Goncalves Filho J y Perri SH, 2010, Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol*, 170, 131-133.
- Oliva G, Gradoni L, Ciaramella P, De Luna R, Cortese L, Orsini S, Davidson RN y Persechino A, 1995, Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Antimicrob Chemother*, 36, 1013-1019.
- Oliveira AL, Brustoloni YM, Fernandes TD, Dorval ME, Cunha RV y Boia MN, 2009a, Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. *Trop Doct*, 39, 180-182.
- Oliveira CD, Assuncao RM, Reis IA y Proietti FA, 2001, Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saude Publica*, 17, 1231-1239.

- Oliveira F, Doumbia S, Anderson JM, Faye O, Diarra SS, Traore P, Cisse M, Camara G, Tall K, Coulibaly CA, Samake S, Sissoko I, Traore B, Diallo D, Keita S, Fairhurst RM, Valenzuela JG y Kamhawi S, 2009b, Discrepant prevalence and incidence of *Leishmania* infection between two neighboring villages in Central Mali based on Leishmanin skin test surveys. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, e565.
- Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L y Fondati A, 2005, Papular dermatitis due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol*, 16, 187-191.
- Oshaghi MA, Ravasan NM, Javadian E, Rassi Y, Sadraei J, Enayati AA, Vatandoost H, Zare Z y Emami SN, 2009, Application of predictive degree day model for field development of sandfly vectors of visceral leishmaniasis in northwest of Iran. *J Vector Borne Dis*, 46, 247-255.
- Ostfeld RS, Roy P, Haumaier W, Canter L, Keesing F y Rowton ED, 2004, Sand fly (*Lutzomyia vexator*) (Diptera: Psychodidae) populations in upstate New York: abundance, microhabitat, and phenology. *J Med Entomol*, 41, 774-778.
- Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G y Stanneck D, 2007, Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol*, 144, 270-278.
- Otranto D, Capelli G y Genchi C, 2009, Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasit Vectors*, 2 Suppl 1, S2.
- Otranto D y Dantas-Torres F, 2010, Fleas and ticks as vectors of *Leishmania spp.* to dogs: caution is needed. *Vet Parasitol*, 168, 173-174.
- Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P y Giger U, 2001, Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 219, 1076-1083.
- Palacio J, Liste F y Gascón M, 1995, Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 137, 567-568.
- Palacio J, Liste F y Gascón M, 1997, Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 140, 477-480.
- Palatnik-de-Sousa CB, 2008, Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, 26, 1709-1724.
- Papadogiannakis E, Spanakos G, Kontos V, Menounos PG, Tegos N y Vakalis N, 2009, Molecular Detection of *Leishmania infantum* in Wild Rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health*, en prensa.
- Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C y Antoniadis G, 2005, Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect*, 50, 53-60.
- Patz JA, Graczyk TK, Geller N y Vittor AY, 2000, Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol*, 30, 1395-1405.
- Paz GF, Ribeiro MF, Michalsky EM, da Rocha Lima AC, Franca-Silva JC, Barata RA, Fortes-Dias CL y Dias ES, 2010, Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, 106, 523-528.
- Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M y Vitale F, 2005, Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun*, 29 Suppl 2, 301-303.
- Peña MT, Roura X y Davidson MG, 2000, Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol*, 3, 35-41.
- Peña MT, Naranjo C, Klaus G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG y Dubielzig RR, 2008, Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *J Comp Pathol*, 138, 32-39.

- Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, Mischke R, Diniz P, Breitschwerdt EB, Kritsepi M, Garipidou VA, Koutinas CK y Lekkas S, 2008, Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med*, 22, 866-872.
- Peterson AT y Shaw J, 2003, *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *Int J Parasitol*, 33, 919-931.
- Pfeiffer DU, Robinson TP, Stevenson M, Stevens KB, Rogers DJ y Clements ACA, 2008, Spatial Analysis in Epidemiology. Oxford University Press, United States, 142 pp.
- Picado A, Das ML, Kumar V, Dinesh DS, Rijal S, Singh SP, Das P, Coosemans M, Boelaert M y Davies C, 2010, *Phlebotomus argentipes* seasonal patterns in India and Nepal. *J Med Entomol*, 47, 283-286.
- Pilatti MM, Ferreira Sde A, de Melo MN y de Andrade AS, 2009, Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res Vet Sci*, 87, 255-257.
- Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M y Sacks DL, 1997, A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115 (Pt 4), 359-369.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G y Ruitenbergh J, 1994, Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*, 62, 229-235.
- Pires CA, 1985. Ós flebótomos de Portugal (Insecta, Diptera, Psychodidae). II. Distribuição variação anual e altitudinal dos flebótomos do foco zoonótico da Arrábida. En: Actas do II Congresso Ibérico de Entomologia Lisboa, pp. 83-94.
- Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou LG, Saridomichelakis MN, Savvas I y Leontides L, 2006, Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med*, 20, 228-233.
- Podaliri Vulpiani M, Iannetti L, Di Mattia T y Dalla Villa P, 2009, *Leishmania infantum* in a Central Italy dog shelter: Retrospective study of serologic reactivity during a 4-year period in a confined dog population subjected to preventive and therapeutic treatment. *Vet Parasitol*, 160, 190-197.
- Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S y Bionda A, 1991, Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*, 57, 444-452.
- Poot J, Spreeuwenberg K, Sanderson SJ, Schijns VE, Mottram JC, Coombs GH y Vermeulen AN, 2006, Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine*, 24, 2460-2468.
- Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A y Grimaldi G, Jr., 2007, Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 544-548.
- Portús M, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, Fisa R y Castillejo S, 2002, Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev Iber Parasitol*, 62, 72-76.
- Pujol A, Cortés E, Ranz A, Vela C, Aguiló. C. y Martí B, 2005. Estudio de seroprevalencia de leishmaniasis (*L. infantum*) y de ehrlichiosis (*E. canis*) en la isla de Mallorca mediante técnicas inmunológicas. En: Congreso de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio (AVEDILA), pp. 9-12.

- Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M y Ferrer L, 1991, Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol*, 105, 279-286.
- Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA y Gontijo CM, 2009, Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop*, 111, 289-294.
- Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W y Ollier WE, 2003, Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55, 23-28.
- Quinnell RJ y Courtenay O, 2009, Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 1-20.
- Rafati S, Nakhaee A, Taheri T, Taslimi Y, Darabi H, Eravani D, Sanos S, Kaye P, Taghikhani M, Jamshidi S y Rad MA, 2005, Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine*, 23, 3716-3725.
- Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A y Koutinas AF, 2005, Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol*, 132, 145-152.
- Ramalho-Ortigao JM, Kamhawi S, Joshi MB, Reynoso D, Lawyer PG, Dwyer DM, Sacks DL y Valenzuela JG, 2005, Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol Biol*, 14, 703-712.
- Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodríguez D, Rodríguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA y Larraga V, 2003, Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, 21, 2474-2484.
- Ready PD y Croset H, 1980, Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera:Psychodidae) from southern France. *Bulletin of Entomological Research*, 70, 511-523.
- Ready PD, 2008, Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech*, 27, 399-412.
- Ready PD, 2010, Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, 15, 19505.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O y Correa-Oliveira R, 2006, Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 81, 68-75.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL y Correa-Oliveira R, 2009, Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 87-95.
- Reisen WK, 2010, Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol*, 55, 461-483.
- Reithinger R y Davies CR, 1999, Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg*, 61, 530-541.
- Reithinger R, Teodoro U y Davies CR, 2001, Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerg Infect Dis*, 7, 872-876.
- Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G y Davies CR, 2004, Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol*, 34, 55-62.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B y Brooker S, 2007, Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7, 581-596.

- Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frezard F y Michalick MS, 2008, Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2564-2572.
- Rinaldi L, Musella V y Cringoli G, 2006a, Disease mapping in veterinary parasitology: an update. *Parassitologia*, 48, 85-87.
- Rinaldi L, Musella V, Biggeri A y Cringoli G, 2006b, New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary parasitology. *Geospat Health*, 1, 33-47.
- Rioux JA, Albaret JL, Houin R, Dedet JP y Lanotte G, 1968, [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 2. Selvatic reservoirs. Spontaneous infestation of the fox (*Vulpes vulpes* L.)]. *Ann Parasitol Hum Comp*, 43, 421-428.
- Rioux JA, Golvan YJ, Houin R, Croset H y Tour S, 1970, Résultats d'un enquête écologique sur le foyer leishmanien des Cévennes meridionales. *Revue de Médecine*, 18, 1039-1052.
- Rioux JA, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Young CJ, Turner DP, Lanotte G y Bailly M, 1979, [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 11. Canine leishmaniasis: successful experimental transmission from dog to dog by the bite of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 (author's transl)]. *Ann Parasitol Hum Comp*, 54, 401-407.
- Rioux JA, Guilvard E, Gállego J, Moreno G, Pratlong F, Portús M, Rispaill P, Gállego M, Bastien P, 1986, *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer: Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne), En: IMEEE (Ed.) *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Éco-Épidémiologiques. Montpellier, pp. 439-444.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P y Perieres J, 1990, Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 65, 111-125.
- Rispaill P, Dereure J y Jarry D, 2002, Risk zones of human Leishmaniasis in the Western Mediterranean basin: correlations between vector sand flies, bioclimatology and phytosociology. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97, 477-483.
- Rivas-Martínez S, 1983, Pisos bioclimáticos de España. *Lazaroa*, 5, 33-43.
- Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, Sánchez-Robert E, Francino O y Alberola J, 2007, Vaccination with plasmid DNA encoding KMP2, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine*, 25, 7962-7971.
- Rogers ME, Chance ML y Bates PA, 2002, The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124, 495-507.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA y Bates PA, 2004, Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430, 463-467.
- Rondon FC, Bevilaqua CM, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcantara AC y Diniz AT, 2008, Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceara state, Brazil. *Vet Parasitol*, 155, 24-31.
- Rosado D, Arrieta E, Morillas-Márquez F, Nieto CG y Navarrete I, 1995. Estudio preliminar sobre la fenología y distribución de los flebotomos (Diptera:Psychodidae) en la ciudad de Cáceres (España). En: VI Congreso Ibérico de Parasitología, Santiago de Compostela, p. 125.
- Rossi E, Rinaldi L, Musella V, Veneziano V, Carbone S, Gradoni L, Cringoli G y Maroli M, 2007, Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy. *Geospat Health*, 1, 191-198.

- Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, Gradoni L y Maroli M, 2008, 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*, 105, 158-165.
- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G y Lindsay DS, 2005, Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol*, 91, 970-972.
- Ryan JR, Mbui J, Rashid JR, Wasunna MK, Kirigi G, Magiri C, Kinoti D, Ngumbi PM, Martin SK, Odera SO, Hochberg LP, Bautista CT y Chan AS, 2006, Spatial clustering and epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in two endemic villages, Baringo District, Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 74, 308-317.
- Sacks D y Kamhawi S, 2001, Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*, 55, 453-483.
- Salah AB, Kamarianakis Y, Chlif S, Alaya NB y Prastacos P, 2007, Zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Tunisia: spatio temporal dynamics. *Int J Epidemiol*, 36, 991-1000.
- Salomón OD, Wilson ML, Munstermann LE y Travi BL, 2004, Spatial and temporal patterns of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in northern Argentina. *J Med Entomol*, 41, 33-39.
- Sánchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sánchez A y Francino O, 2008, Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*, 39, 36.
- Sanchís Marín MC, Morillas-Márquez F, González-Castro J, Benavides-Delgado I y Reyes Magaña A, 1986, Dinámica estacional de los flebotomos (Diptera:Psychodidae) de la provincia de Almería (España). *Rev Iber Parasitol*, 46, 285-291.
- Sanchís Marín MC, Martín Sánchez J, Amate P, Acedo Sánchez C, Miras N, Mostapha L y Morillas F, 1997, Estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la comarca del Campo de Níjar (Almería). *Ars Pharmaceutica*, 38, 53-61.
- Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romao P y Silveira H, 2002, Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 88, 21-30.
- Santos FN, Borja-Cabrera GP, Miyashiro LM, Grechi J, Reis AB, Moreira MA, Martins Filho OA, Luvizotto MC, Menz I, Pessoa LM, Goncalves PR, Palatnik M y Palatnik-de-Sousa CB, 2007, Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine*, 25, 6176-6190.
- Saraiva EM, de Figueiredo Barbosa A, Santos FN, Borja-Cabrera GP, Nico D, Souza LO, de Oliveira Mendes-Aguiar C, de Souza EP, Fampa P, Parra LE, Menz I, Dias JG, Jr., de Oliveira SM y Palatnik-de-Sousa CB, 2006, The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, 24, 2423-2431.
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C y Kontos VI, 2005, Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg*, 73, 82-86.
- Sastre N, Francino O, Ramírez O, Ensenat C, Sánchez A y Altet L, 2008, Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Vet Parasitol*, 158, 117-120.
- Schlein Y, Borut S y Jacobson RL, 1990, Oviposition diapause and other factors affecting the egg-laying of *Phlebotomus papatasi* in the laboratory. *Med Vet Entomol*, 4, 69-78.
- Schlein Y, Jacobson RL y Shlomei J, 1991, Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. *Proc Biol Sci*, 245, 121-126.
- Schlein Y, Jacobson RL y Messer G, 1992, *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9944-9948.

- Schriefer A, Guimaraes LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, Ritt G, Goes-Neto A, Schriefer AL, Riley LW y Carvalho EM, 2009, Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*, 15, 871-876.
- Schroder W y Schmidt G, 2008, 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*, 103 Suppl 1, S55-63.
- Secundino NF, Eger-Mangrich I, Braga EM, Santoro MM y Pimenta PF, 2005, *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. *J Med Entomol*, 42, 928-938.
- Seguí MG, 1991a, Estudi epidemiològic de la leishmaniosi a l'illa de Menorca. *Revista de Ciència*, 9, 91-101.
- Seguí MG, 1991b. Estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la isla de Menorca. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, 324 pp.
- Semenza JC y Menne B, 2009, Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infect Dis*, 9, 365-375.
- Shakarian AM y Dwyer DM, 2000, Pathogenic *Leishmania* secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. *Exp Parasitol*, 94, 238-242.
- Sharma U y Singh S, 2008, Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45, 255-272.
- Shaw JJ, 2006, Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101, 577-579.
- Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF y Santos RL, 2009, Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 160, 55-59.
- Singh R, Das RK y Sharma SK, 2001, Resistance of sandflies to DDT in Kala-azar endemic districts of Bihar, India. *Bull World Health Organ*, 79, 793.
- Slappendel RJ, 1988, Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q*, 10, 1-16.
- Slenning BD, 2010, Global climate change and implications for disease emergence. *Vet Pathol*, 47, 28-33.
- Sobrinho R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A y Gortazar C, 2008, Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol*, 155, 198-203.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J y Ferrer L, 2000, The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 90, 37-45.
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gállego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M y Portús M, 2001, *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol*, 96, 265-276.
- Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A y Ferrer L, 2004, Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol*, 130, 7-12.
- Solano-Gallego L, Llull J, Osso M, Hegarty B y Breitschwerdt E, 2006, A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet Res*, 37, 231-244.
- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, Portus M y Alberola J, 2007, Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 676-680.

- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G y Baneth G, 2009, Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 165, 1-18.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L y Baneth G, 2004, Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis*, 189, 1729-1733.
- Sutherst RW, 2004, Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17, 136-173.
- Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L y Ruiz de Gopegui R, 2008a, Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J Small Anim Pract*, 49, 325-328.
- Tabar MD, Altet L, Francino O, Sánchez A, Ferrer L y Roura X, 2008b, Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet Parasitol*, 151, 332-336.
- TDR 2002. Leishmaniasis. In Strategic Direction for Research (Geneva), pp. 1-5.
- Teixeira Neto RG, Giunchetti RC, Carneiro CM, Vitor RW, Coura-Vital W, Quaresma PF, Ker HG, de Melo LA, Gontijo CM y Reis AB, 2010, Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 169, 248-257.
- Thomson MC, Elnaiem DA, Ashford RW y Connor SJ, 1999, Towards a kala azar risk map for Sudan: mapping the potential distribution of *Phlebotomus orientalis* using digital data of environmental variables. *Trop Med Int Health*, 4, 105-113.
- Thomson MC y Connor SJ, 2000, Environmental information system for the control of arthropod vectors of disease. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, 227-244.
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C y Osorio Y, 2001, Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg*, 64, 119-124.
- Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L y Saravia NG, 2002, Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania spp.* *Infect Immun*, 70, 2288-2296.
- Trigo J, Abbehussen M, Netto EM, Nakatani M, Pedral-Sampaio G, de Jesus RS, Goto Y, Guderian J, Howard RF y Reed SG, 2010, Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. *Vaccine*, 28, 3333-3340.
- Tuon FF, Neto VA y Amato VS, 2008, *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54, 158-166.
- Vaidyanathan R, 2004, *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects. *J Invertebr Pathol*, 87, 123-128.
- Vaidyanathan R, 2005, Isolation of a myoinhibitory peptide from *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and its function in the vector sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 42, 142-152.
- Valcárcel Y, Bastero R, Anegón M, González S y Gil A, 2008, Epidemiología de los ingresos hospitalarios por leishmaniasis en España (1999-2003)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26, 278-281.
- Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Méndez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL y Ribeiro JM, 2001, Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med*, 194, 331-342.
- Valladares JE, Alberola J, Esteban M y Arboix M, 1996, Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Rec*, 138, 181-183.
- Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G y Saridomichelakis M, 2000, Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec*, 146, 698-703.

- Vercosa BL, Lemos CM, Mendonca IL, Silva SM, de Carvalho SM, Goto H y Costa FA, 2008, Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res*, 4, 45.
- Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, Perez M, Walker J, Travi BL y Saravia NG, 2006, Evidence for *Leishmania (viannia)* parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis*, 194, 503-511.
- Viñuelas J, García-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, Carcelen J, Alonso C y Nieto CG, 2001, Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 101, 23-27.
- Volf P, Hajmova M, Sadlova J y Votycka J, 2004, Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int J Parasitol*, 34, 1221-1227.
- Ward RD, Phillips A, Burnet B, Marcondes CB, 1988, The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. *Biosystematics of Haematophagous Insects*, 37, 257-269.
- Ward RD y Morton IE, 1991, Pheromones in mate choice and sexual isolation between siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *Parassitologia*, 33 Suppl, 527-533.
- Ward RD, Hamilton JGC, Dougherty M, Falcao AL, Feliciangeli MD, Perez JE, Veltkamp CJ, 1993, Pheromone disseminating structures in tergites of male phlebotomines (Diptera:Psychodidae). *Bulletin of Entomological Research*, 83, 437-445.
- Washino RK y Wood BL, 1994, Application of remote sensing to arthropod vector surveillance and control. *Am J Trop Med Hyg*, 50, 134-144.
- Werneck GL y Maguire JH, 2002, Spatial modeling using mixed models: an ecologic study of visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad Saude Publica*, 18, 633-637.
- Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M y Maguire JH, 2002, The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiology*, 13, 364-367.
- Werneck GL, Costa CH, Walker AM, David JR, Wand M y Maguire JH, 2007, Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect*, 135, 195-201.
- Woerly V, Maynard L, Sanquer A y Eun HM, 2009, Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res*, 105, 463-469.
- Wolf Echeverri MI, 1996. Epidemiología de la Leishmaniosis en el sur de España Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Granada, Granada.
- Wolschrijn CF, Meyer HP, Hazewinkel HA y Wolvekamp WT, 1996, Destructive polyarthritis in a dog with leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 37, 601-603.
- Yeagley TJ, Reichard MV, Hempstead JE, Allen KE, Parsons LM, White MA, Little SE y Meinkoth JH, 2009, Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small Babesia 'Spanish isolate' in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *J Am Vet Med Assoc*, 235, 535-539.
- Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P y Mignone W, 1999, Epidemiological patterns of canine leishmaniasis [correction of leishmaniosis] in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitol*, 81, 11-19.
- Zaghloul IY y Al-Jasser M, 2004, Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. *Ann Trop Med Parasitol*, 98, 793-800.
- Zárate JJ, Castillo JA, Blanco JC, Cortés Y, Sáez de Buruaga M, Gortazar C, Fernández de Luco D y Lucientes J, 2000. Serological study of Leishmaniosis (*Leishmania spp.*) in Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). En: 4th Meeting of the European Wildlife Disease Association, Zaragoza, p. 66.
- Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A y Guarraci A, 2003, Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res*, 64, 558-561.

- Zhi-Biao X, 1989, Present situation of visceral leishmaniasis in China. *Parasitol Today*, 5, 224-228.
- Zivicnjak T, Martinkovic F, Marinculic A, Mrljak V, Kucer N, Matijatko V, Mihaljevic Z y Baric-Rafaj R, 2005, A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet Parasitol*, 131, 35-43.

