



Los flebotomos de las islas de Mallorca y Menorca y su papel focalizador en la distribución de las leishmaniosis

Maria Magdalena Alcover Amengual

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

LOS FLEBOTOMOS DE LAS ISLAS DE MALLORCA Y MENORCA Y SU PAPEL
FOCALIZADOR EN LA DISTRIBUCIÓN DE LAS LEISHMANIOSIS

Maria Magdalena Alcover Amengual
2014

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

PROGRAMA DE DOCTORADO

Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

LOS FLEBOTOMOS DE LAS ISLAS DE MALLORCA Y MENORCA Y SU PAPEL
FOCALIZADOR EN LA DISTRIBUCIÓN DE LAS LEISHMANIOSIS

Memoria presentada por Maria Magdalena Alcover Amengual para optar al título de
doctor por la Universitat de Barcelona

Directora de la tesis

Montserrat Gállego Culleré

Doctoranda

Maria Magdalena Alcover Amengual

M. Magdalena Alcover Amengual
2014

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

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Los flebotomos de las Islas de Mallorca y Menorca y su papel focalizador en la distribución de las leishmaniosis”, presentado por la licenciada en Farmacia M^a Magdalena Alcover Amengual, ha sido realizado en la Unitat de Parasitologia del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Universitat de Barcelona bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral con Mención Internacional.

Barcelona, 15 de Octubre de 2014

Dra. Montserrat Gállego Culleré

Directora de la Tesis Doctoral

M^a Magdalena Alcover Amengual

Doctoranda

La realización de este estudio ha sido financiada, en gran parte, por una beca del Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (proyecto CGL2007-66943-C02-01/BOS) destinada al estudio de las leishmaniosis de les Illes Balears. En dicho proyecto gozamos de un contrato de Técnico Superior en el periodo comprendido entre 1 de Noviembre del 2008 y 25 de Septiembre del 2010.

También se ha contado con el soporte del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (proyecto 2009SGR385).

Per l'Essència de tot el que estimo en el món...

Gràcies!

Pocas son las cosas que podemos hacer solos en la vida y, ciertamente, una tesis no es una de ellas; por eso son tantísimas las personas a las que he de agradecer el camino recorrido juntos.

En primer lugar, a la directora Montserrat Gállego Culleré, Profesora Titular de la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Montse, han sido unos años compartidos más allá de la experiencia de investigación. Dicen que la vida hemos de intentar vivirla de forma integrada y, en verdad, la experiencia en el departamento, el compartir inquietudes entomológicas, sanitarias, de docencia, y la vida en sí misma, nos ha enseñado a intentar vivirlo todo de este modo, nos ha posibilitado el procurar ser nosotras mismas fuera y dentro de la Facultat, acogiéndonos desde la complejidad que nos es propia como seres humanos.

A la Dra. Montserrat Portús Vinyeta, Catedrática emérita de la Unitat de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Gracias por poner al servicio de esta investigación todo tu caudal de sabiduría, gracias por tu apoyo y por tus revisiones del trabajo a lo largo de todos estos años. Me han ayudado a confiar más en mí misma.

Alla Dr.ssa Marina Gramiccia per la sua preziosa guida nell'ambito della ricerca sia durante la mia permanenza nell'ISS che successivamente. Sei una grande ricercatrice e soprattutto una persona meravigliosa

A la Dra. Teresa Serra por tu entusiasmo, por creer en lo que hacemos, porque consigues que la ciencia y la vida caminen juntas. Gracias, sencillamente, por ser como eres.

A los Dres Ricardo Molina, Francisco Morillas y Bernard Pesson gracias por haber aceptado formar parte del tribunal y sus comentarios y sugerencias al trabajo.

A los Dres. Xavier Castells, Joaquina Martín-Sánchez y Albert Picado gracias por vuestra inmensa ayuda con los números. Gracias también a vosotros, este resultado es estadísticamente significativo.

Gracias a la Dra. Cristina Ballart por acompañarme y ayudarme en tantos campos diferentes: Hemos capturado, identificado, hecho mapas, ... hemos crecido en este ámbito más o menos juntas.

Un ringraziamento particolare alla Dr.ssa Trentina Di Muccio per avermi aiutato ad affacciarmi alla biología molecolare. Per avermi accolto nella tua famiglia. Sei una persona speciale, impegnata nella scienza e nella famiglia.

Ringrazio il Dr. Aldo Scalone, per avermi fornito insegnamenti preziosi nell'utilizzo della tecnica dell'immunofluorescenza. Un grazie particolare per la sua grande disponibilità durante i mesi di stage a Roma.

De manera especial, gracias a Anna Lanau porque has compartido conmigo, de forma desinteresada, meses de julio en los que me has aportado aire fresco y me has acercado a la juventud de hoy, a la vez que continuábamos con nuestras campañas de captura.

Gracias al Colegio de Veterinarios de las Islas Baleares, de un modo especial a Ramón García y Amanda Figueroa: Nos facilitasteis el ponernos en contacto con veterinarios y dueños de perros y el hacerlos partícipes de nuestras inquietudes.

Gracias a las veterinarias Raquel Aranda, Marian Huguet y Estrella Sintés: Vuestra ayuda ha sido fundamental para poder realizar gran parte de este estudio. Gracias por el testimonio de seriedad y de compromiso con vuestro trabajo.

Gracias a la Dra. Maria Gracia Seguí: Nos enseñaste tu tierra, nos la hiciste sentir como propia, y, a tu lado, fuimos capaces de viajar en el tiempo.

Gracias al Centro de Epidemiología de las Islas Baleares, en concreto a Antoni Nicolau: En todo momento me facilitaste los datos que requería para poder interpretar los resultados, gracias.

Gracias al Dr. J. Abellán, del Centre Insular de Sanitat de Menorca: De forma sencilla y llana pusiste a mi alcance los datos sobre el caso humano de leishmaniosis declarado en tu isla.

Gracias a Sole, a Olga, a Mercedes, a Matías por echarme una mano en el trabajo diario y por vuestros sabios consejos en el sentido más amplio de la palabra. Gracias.

Gracias a Silvia, Laura, Eleonora: Habéis sido y sois compañeras de trabajo y amigas.

A las generaciones que vienen detrás y que nos empujan y ayudan a caminar con entusiasmo, a reconocer el camino ya hecho y a reafirmarnos en que la vida se vive día a día en las pequeñas y grandes cosas y siempre que se puede, en compañía, gracias: El estar presentes nos lo debemos los unos a los otros. Queridas Albas, Miriam, Anna, Diana, Roser: Lo que se comparte se multiplica, y con vosotras lo estoy viviendo cada día. Gracias.

Gracias a todos: A Carles, Isabel, Cristina, Jordi, Roser, Marisol, Jordi, Mercedes, Alexis, Carme, y a todos aquellos que, en un momento u otro, han pasado por el Departamento de Parasitología. De manera especial gracias a ti, Joan Carles: Seguro que contemplas este momento sonriendo con la mirada. Caminamos juntos, contad conmigo.

A tots els mallorquins, menorquins, eivissencs i formenterers, als pagesos, als veterinaris, als amos de cans i finques... a la meva terra, has estat matèria d'estudi i el fet de que et senti tant meva m'ha ajudat a mantenir-me al llarg d'aquests anys per tirar endavant amb aquesta tasca.

A les meves famílies..., no sé dir-vos res més, GRÀCIES. Vosaltres heu estat i sou els meus vers directors de vida, m'heu ensenyat que aprenem quan es descobreix el món en companyia d'altres, quan aprenem a mirar no tan sols des de la nostra mirada sinó des de la perspectiva de l'altre, i que el que ens ajuda a donar el millor de nosaltres mateixos és estimar i deixar-nos estimar, és confiar en l'altre i sentir que confien en tu. Us estimo i em sento molt estimada.

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1.- LOS FLEBOTOMOS VECTORES DE LAS LEISHMANIOSIS	5
I.1.1.- MORFOLOGÍA DE LOS FLEBOTOMOS	9
I.1.2.- BIOLOGÍA Y ETOLOGÍA DE LOS FLEBOTOMOS	11
I.1.3.- IMPORTANCIA SANITARIA DE LOS FLEBOTOMOS	14
I.1.3.1. Incriminación de las especies vectoras	18
I.2.- LAS LEISHMANIOSIS	19
I.3.- ANTECEDENTES DE LOS FLEBOTOMOS Y DE LAS LEISHMANIOSIS EN LAS ISLAS BALEARES	22
I.3.1.- LOS FLEBOTOMOS DE LAS ISLAS BALEARES	22
I.3.2.- LA LEISHMANIOSIS HUMANA DE LAS ISLAS BALEARES	24
I.3.3.- LA LEISHMANIOSIS CANINA DE LAS ISLAS BALEARES	30
II.- HYPOTHESIS, OBJECTIVES AND WORK PLAN	33
II.1.- HYPOTHESIS	35
II.2.- OBJECTIVES	36
II.3.- WORK PLAN	36
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	39
III.1.- ZONA DE ESTUDIO	41
III.2.- ESTUDIO DE LOS FLEBOTOMOS	41
III.3.- ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA	42

III.4.- ESTUDIO ESTADÍSTICO	43
IV.- RESULTADOS	45
IV.1.- CAPÍTULO 1	47
Application of molecular techniques in the study of natural infection of <i>Leishmania infantum</i> vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis.	
IV.2.- CAPÍTULO 2	59
Temporal trends in canine leishmaniosis in the Balearic Islands (Spain): A veterinary questionnaire. Prospective canine leishmaniosis survey and entomological studies conducted on the Island of Minorca, 20 years after first data were obtained.	
IV.3.- CAPÍTULO 3	71
Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to <i>Phlebotomus perniciosus</i> , vector of <i>Leishmania infantum</i> .	
V.- DISCUSIÓN	85
VI.- CONCLUSIONS	107
VII.- ANEXOS	113
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	131

I.- INTRODUCCIÓN

“Me l'he estimada més que la salut i la bellesa,
i, abans que la llum, l'he volguda a ella,
perquè no mor mai la seva claror”

Del llibre de la Saviesa 7,10

I.-INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria presente en 101 países (80 países del Viejo Mundo y 21 países del Nuevo Mundo) (Maroli y col., 2013; WHO, 2012). Es una de las enfermedades tropicales desatendidas más significativa, ya que 350 millones de personas de todo el mundo viven en situación de riesgo de desarrollar una de las múltiples formas de la enfermedad (WHO, 2012).

Está causada por la infección de un parásito protozooario del género *Leishmania*, que mantiene su ciclo a través de la transmisión por la picadura de unos nematóceros de la familia Phlebotomidae, los flebotomos (WHO, 2012). La presencia de los flebotomos es el elemento focalizador de la enfermedad y uno de los factores que influye en la distribución heterogénea de la misma (Rioux y col., 1970).

En los últimos años, se está observando una influencia de los cambios económicos, migratorios, sociales y medioambientales en la distribución geográfica de determinadas enfermedades transmisibles, entre las que se encuentra la leishmaniosis. Entre los cambios medioambientales cabría citar la deforestación, el cambio climático, con un incremento de la temperatura y una disminución de las precipitaciones y de la humedad (Ashford, 2000; Desjeux, 2001; Gállego, 2004, Githeko y col., 2000).

Se estima que se está produciendo un incremento de la temperatura a nivel global, aumentando de promedio 1-3,5°C en el año 2100, y que dicho cambio afectará fundamentalmente en los extremos de intervalo requeridos para la transmisión vectorial (14-18°C hasta 35-40°C, dependiendo de los agentes patógenos) (Githeko y col., 2000). En Europa, la temperatura se ha calentado en promedio aproximado de 1 °C en el último siglo, a un ritmo mayor que el promedio global, y España se ha calentado más que el promedio europeo (entre 1,2 °C y 1,5 °C) (El cambio climático en España. Estado de situación, 2007). Desde 1850 hasta 2005 se ha ido produciendo un incremento periódico de las temperaturas, tanto mínima como máxima, diarias (Figura 1) (Generación de escenarios regionalizados de cambio climático para España, 2009).

Periodos	1850-2005	1901-2005	1901-1949	1950-1972	1973-2005
Temperaturas medias diarias					
Anual	0,10 (0,08/0,12)	0,13 (0,10/0,16)	0,22 (0,11/0,31)	-0,19 (-0,53/0,12)	0,48 (0,36/0,66)
Invierno	0,10 (0,07/0,14)	0,14 (0,08/0,20)	0,10 (-0,08/0,32)	0,11 (-0,58/0,68)	0,27 (-0,09/0,56)
Primavera	0,08 (0,05/0,12)	0,12 (0,06/0,17)	0,25 (0,06/0,43)	-0,52 (-1,03/0,05)	0,77 (0,54/0,97)
Verano	0,09 (0,06/0,11)	0,13 (0,08/0,18)	0,23 (0,07/0,38)	-0,29 (-0,71/0,13)	0,67 (0,41/0,92)
Otoño	0,10 (0,07/0,13)	0,12 (0,08/0,17)	0,26 (0,09/0,42)	-0,08 (-0,57/0,53)	0,29 (0,02/0,58)
Temperaturas máximas diarias					
Anual	0,11 (0,09/0,14)	0,17 (0,13/0,21)	0,37 (0,25/0,46)	-0,28 (-0,74/0,16)	0,51 (0,34/0,66)
Invierno	0,12 (0,09/0,15)	0,16 (0,10/0,21)	0,18 (-0,02/0,36)	-0,04 (-0,61/0,62)	0,35 (0,06/0,60)
Primavera	0,11 (0,06/0,15)	0,17 (0,11/0,23)	0,37 (0,16/0,60)	-0,62 (-1,38/0,09)	0,82 (0,53/1,15)
Verano	0,10 (0,06/0,13)	0,18 (0,12/0,24)	0,44 (0,27/0,64)	-0,30 (-0,88/0,17)	0,73 (0,43/1,04)
Otoño	0,12 (0,09/0,15)	0,17 (0,10/0,22)	0,44 (0,26/0,64)	-0,12 (-0,84/0,70)	0,13 (-0,17/0,47)
Temperaturas mínimas diarias					
Anual	0,08 (0,06/0,10)	0,09 (0,06/0,12)	0,08 (-0,02/0,18)	-0,13 (-0,51/0,14)	0,47 (0,31/0,65)
Invierno	0,09 (0,06/0,13)	0,12 (0,05/0,19)	0,06 (-0,15/0,24)	0,15 (-0,56/0,78)	0,06 (-0,28/0,62)
Primavera	0,07 (0,04/0,09)	0,08 (0,03/0,13)	0,15 (0,01/0,31)	-0,19 (-0,72/0,29)	0,66 (0,46/0,84)
Verano	0,08 (0,05/0,10)	0,09 (0,04/0,13)	0,00 (-0,13/0,14)	-0,26 (-0,60/0,08)	0,62 (0,38/0,93)
Otoño	0,08 (0,05/0,11)	0,08 (0,04/0,13)	0,09 (-0,06/0,25)	-0,13 (-0,41/0,33)	0,43 (0,18/0,77)

Tabla 2.1. Tendencias anuales y estacionales de las temperaturas diarias (en °C/década) junto a sus intervalos de confianza al 95% calculadas para diversos periodos. En negrita (itálica) coeficientes significativos al 1% (5%).

Figura 1. Temperaturas durante diferentes periodos en España (tomado de Generación de escenarios regionalizados de cambio climático para España, 2009)

Así, existe la posibilidad de que el área de distribución de los flebotomos se extienda, tanto en latitud como en altitud, con la consecuente expansión de la leishmaniosis (Dereure y col., 2009; Ginteko y col., 2000; Kuhn, 1999; Maroli y col., 2008).

Son numerosos los trabajos que tratan de las enfermedades transmisibles emergentes o re-emergentes que afectan al hombre o a los animales, incluyendo las leishmaniosis (Antoniou y col., 2013; Ashford, 2000; Desjeux, 2001; Gramiccia y Gradoni, 2005; Martín-Sánchez y col., 2009; Ready, 2010). Sin embargo, los estudios realizados sobre la epidemiología de estas parasitosis se han basado principalmente en la aplicación de

técnicas serológicas al estudio de la leishmaniosis humana y canina (Ballart y col., 2013; Cardoso y col., 2004; Cortés y col., 2012; Dereure y col., 2009; Ferroglio y col., 2013; Fisa y col., 1999; Gálvez y col., 2010b; Maroli y col., 2008; Martín-Sánchez y col., 2009; Miró y col., 2007b; Miró y col., 2012; Morosetti y col., 2009; Solano-Gallego y col., 2005) y algunos han incluido además técnicas moleculares (Chitimia y col., 2011; Gómez-Saladín y col., 2005; Morales-Yuste y col., 2012; Riera y col., 2008; Solano-Gallego y col., 2001).

El estudio de los flebotomos ha sido casi exclusivamente de tipo corológico y existen pocos ejemplos en los que se haya analizado su capacidad vectorial, tanto por técnicas clásicas de disección como por técnicas moleculares (Gramiccia y col., 2010; Jiménez y col., 2013; Lucientes y col., 1988; Maia y col., 2009; Martín-Sánchez y col., 2006; Morosetti y col., 2009; Pires, 1984; Rioux y col., 1986).

Existen pocos trabajos acerca de los factores que influyen en la distribución de los flebotomos (Branco y col., 2013; Morosetti y col., 2009; Özbel y col., 2011, Rioux y col., 2013). En España, concretamente en el Valle del Ebro en Valencia, Lérida, Granada, Madrid (Aransay y col., 2004; Ballart y col., 2014; Barón y col., 2011; Gálvez y col., 2011), así como de aquellos en que se ha podido observar una emergencia o re-emergencia de la leishmaniosis, tanto humana (Jiménez y col., 2013) como canina (Ballart y col., 2013; Gálvez y col., 2011; Martín-Sánchez y col., 2009; Miró y col., 2011).

I.1.- LOS FLEBOTOMOS VECTORES DE LAS LEISHMANIOSIS

Los flebotomos (Diptera, Phlebotomidae), son los dípteros que vehiculan las leishmanias a los hospedadores vertebrados.

Los flebotomos constituyen un grupo de pequeños dípteros nematóceros, homogéneo y monofilético, cuya posición taxonómica ha sido objeto de controversia. Se considera que su origen es anterior a los 120 millones de años. La primera especie de este grupo fue descrita en 1786 y, hasta la fecha, se han descrito más de 700 especies (Léger y Depaquit, 2002) (Figura 2).

- Reino Animalia Linnaeus, 1758
 Phylum Arthropoda von Siebold, 1845
 Clase Insecta Linnaeus, 1758
 Orden Diptera Linnaeus, 1758
 Suborden Nematocera
 Familia Psychodidae Newman, 1834
 Subfamilia Phlebotominae Rondani, 1840
 Género *Warileya* Hertig, 1948
 Género *Brumptomyia* França & Parrot, 1921
 Género *Lutzomyia* França 1924
 Género *Chinius* Leng, 1987
 Género *Sergentomyia* França & Parrot, 1920
 Subgénero *Sergentomyia* França & Parrot, 1920
 Sergentomyia minuta (Rondani, 1843)
 Sergentomyia fallax (Parrot, 1921)
 Subgénero *Sintonius* Nitzulescu, 1931
 Subgénero *Spelaeomyia* Theodor, 1948
 Subgénero *Parrotomyia* Theodor, 1958
 Subgénero *Rondanomyia* Theodor, 1958
 Subgénero *Grassomyia* Theodor, 1958
 Subgénero *Parvidens* Theodor & Mesghali, 1964
 Subgénero *Demeillonius* (Davidson, 1980)
 Género *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840
 Subgénero *Spelaeophlebotomus* Theodor, 1948
 Subgénero *Idiophlebotomus* Quate & Fairchild, 1961
 Subgénero *Australophlebotomus* Theodor, 1946
 Subgénero *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840
 Phlebotomus papatasi (Scopoli, 1786)
 Subgénero *Paraphlebotomus* Theodor, 1948
 Phlebotomus (P.) sergenti Sinton, 1928
 Phlebotomus (P.) chabaudi Croset, Abonnenc & Rioux, 1970*
 Phlebotomus (P.) alexandri Sinton, 1928
 Phlebotomus (P.) riouxi Depaquit, Léger & Killick-Kendrick, 1998
 Subgénero *Synphlebotomus* Theodor, 1948
 Subgénero *Larroussius* Nitzulescu, 1931
 Phlebotomus (L.) ariasi Tonnoir, 1921
 Phlebotomus (L.) perniciosus Newstead, 1911
 Phlebotomus (L.) longicuspis Nitzulescu, 1930**
 Phlebotomus (L.) langeroni (Nitzulescu, 1930)
 Subgénero *Adlerius* Nitzulescu, 1931
 Subgénero *Transphlebotomus* Artemiev & Neronov, 1984
 Phlebotomus (T.) mascittii Grassi, 1908
 Subgénero *Euphlebotomus* Theodor, 1948
 Subgénero *Anaphlebotomus* Theodor, 1948
 Phlebotomus (A.) fortunatarum Ubeda Ontiveros, Morillas Marquez,
 Guevara Benitez, Lopez Roman & Cutillas Barrios, 1982***
 Subgénero *Kasaulius* Lewis, 1982

Figura 2. Posición sistemática de los flebotomos (se incluyen sólo las especies presentes en España) (tomado y adaptado de Léger y Depaquit 2002). *Algunos ejemplares podrían pertenecer a *P. riouxi* (Tabbabi y col., 2014 señalan la sinonimia entre ambas especies). **Supuestamente tipo morfológico de *P. perniciosus*. ***Descrita originalmente en el subgénero *Abonnencius*.

La presencia de los flebotomos es, sobre todo, importante en las regiones tropicales y subtropicales, con algunas especies también distribuidas en zonas templadas del hemisferio norte (hasta 50°N) y del hemisferio sur (hasta 40°S) (Killick-Kendrick, 1999) (Figura 3). En el Viejo Mundo se encuentran entre los 45° de latitud norte y los 40° de latitud sur y en América desde Estados Unidos hasta Argentina (Léger y Depaquit, 2002). Su distribución geográfica queda limitada a áreas con temperaturas superiores a los 15,6°C al menos durante 3 meses al año. La presencia de los flebotomos no ha sido señalada en Nueva Zelanda ni en las islas del Pacífico (Killick-Kendrick, 1999; Lane, 1993). Una temperatura óptima próxima a los 30°C y un grado de humedad relativamente elevado favorecen su presencia durante todo el año en las regiones tropicales, mientras que en las regiones templadas, al existir unas condiciones climáticas más variables, su presencia se observa en los periodos estivales (Izri y col., 2006). En dichas regiones templadas están ausentes a una altitud mayor o igual a 1000-1.500 metros (Rioux y col., 1984), aun cuando en Europa se han encontrado por encima de los 2000m (Ballart y col., 2012; Martínez-Ortega, 1985).

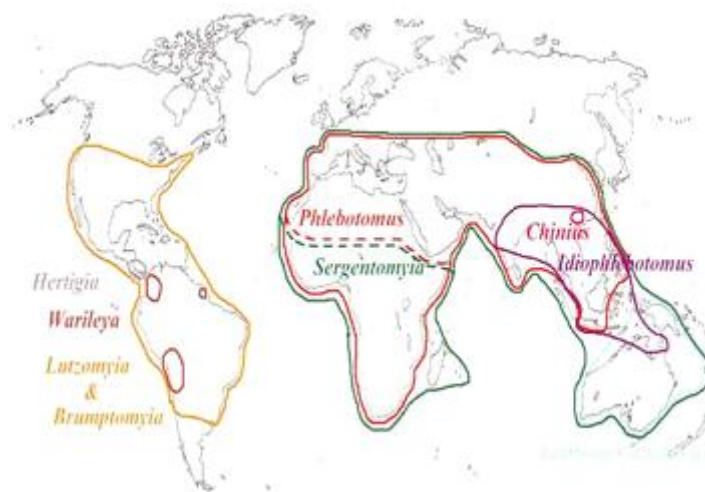


Figura 3. Repartición actual de los principales géneros de flebotomos (Léger y Depaquit, 2002)

Los géneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia* son los que presentan una distribución geográfica más amplia y se encuentran en nuestro entorno. El género *Phlebotomus* tiene una afinidad netamente paleártica, mientras que las especies del género *Sergentomyia* están implantadas sobre todo en África subsahariana y en Asia meridional (Léger y Depaquit, 2002). Los géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* presentan una distribución en el Nuevo Mundo, en el continente americano (Léger y Depaquit, 2002). Por otro lado, los géneros *Chinus* y *Idiophlebotomus* están presentes en China y, además, *Idiophlebotomus* está en la India y en Oceanía (Léger y Depaquit, 2002).

En España, se han citado 13 especies de flebotomos, dos pertenecientes al género *Sergentomyia* y 11 al género *Phlebotomus* (Gállego y col., 2002) (Figura 4).

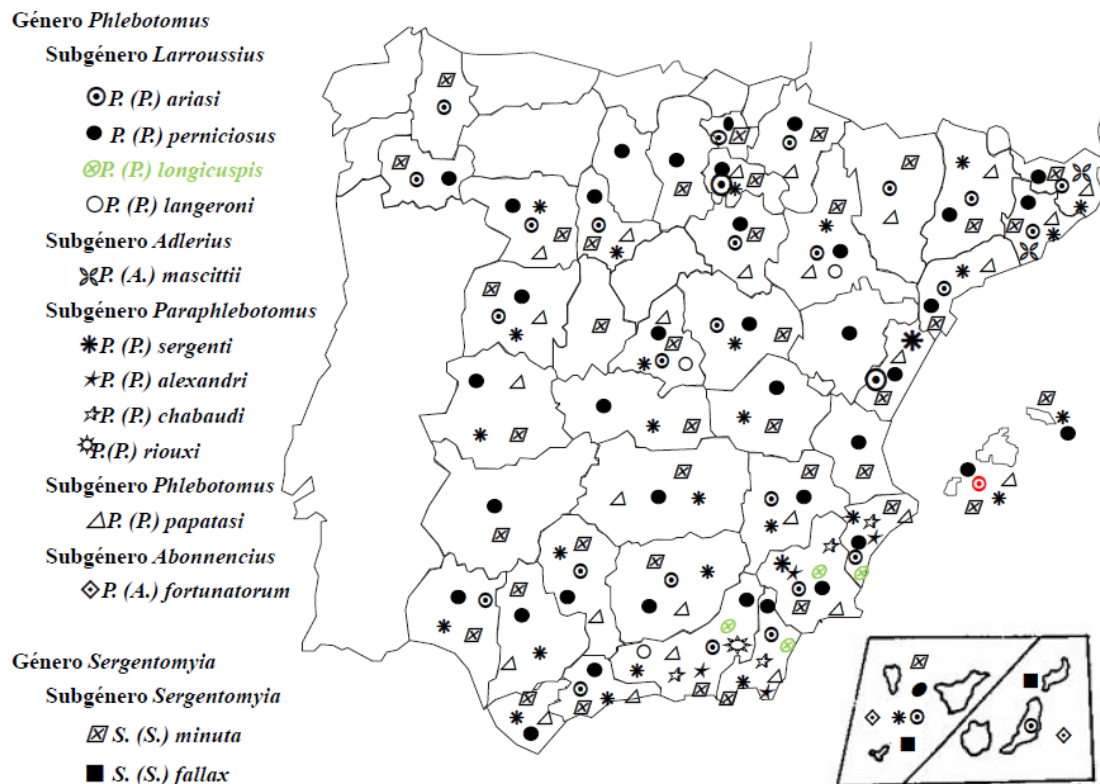


Figura 4.- Distribución de los flebotomos en España (actualizado de Gállego y col. 2002, e incluyendo los últimos datos existentes en España (ver texto). (⊗: supuestamente tipo morfológico de *P. perniciosus*, ⊙: cita dudosa, ver capítulo 3)

Sin embargo, el hallazgo de *P. longicuspis* en el sureste de España (Collantes y Martínez-Ortega, 1997; Martínez-Ortega y Conesa Gallego, 1987; Morillas-Márquez y col., 1991), no debe ser tenido en cuenta, por cuanto estudios posteriores, bioquímicos y moleculares, han mostrado que el tipo morfológico presente en nuestro país pertenece en realidad a *P. perniciosus*, por lo que *P. longicuspis* estaría ausente de España (Guernaoui y col., 2005; Pesson y col., 2004). Así, Miró y Molina (2006) y Aransay y col. (2004) no la incluyen en el listado de las especies halladas en España. Otros trabajos recogidos para la elaboración del mapa son: Depaquit y col., 1998; Díaz Sáez y col., 2013, Lepe y col., 2000; Martínez-Ortega y col., 1988. La fauna española estaría constituida por 12 especies: dos pertenecientes al género *Sergentomyia* y 10 al género *Phlebotomus*.

I.1.1.- MORFOLOGÍA DE LOS FLEBOTOMOS

Los flebotomos se reconocen, a simple vista, por su pequeña talla, entre 1-4 mm, su color generalmente pálido (amarillento, grisáceo o marronáceo), y por su aspecto peludo y giboso (Figura 5) (Izri y col., 2006, Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 2002). En la cabeza presentan un par de ojos compuestos, antenas con 16 artejos alargados y provistos de cerdas cortas y de ascoides y el aparato bucal corto, completo en las hembras y careciendo de mandíbulas en los machos. En el tórax, giboso y muy peludo, presentan un par de alas lanceoladas, pilosas y con una venación característica, formándose una doble horquilla en la 2ª vena longitudinal y una horquilla simple en la 4ª vena. Es también característica la posición de las alas en reposo, levantadas y formando un ángulo de 45°, en V, por encima del tórax.



Figura 5. Macho de *P. perniciosus* (Izri y col., 2006)

Al final del abdomen, formado por 10 segmentos, se encuentra el aparato genital de ambos sexos (en los tres últimos segmentos, visiblemente modificados).

En las hembras (Figura 6), la genitalia está formada por un par de espermatecas que están en contacto, en el noveno segmento, con la abertura ventral de la vagina, el atrio genital, rodeado de una pared quitinosa abierta hacia detrás, y la furca. La morfología de las espermatecas, constituida por un conducto, un cuerpo y la cabeza, es ampliamente utilizada en sistemática y para la diferenciación de las especies.

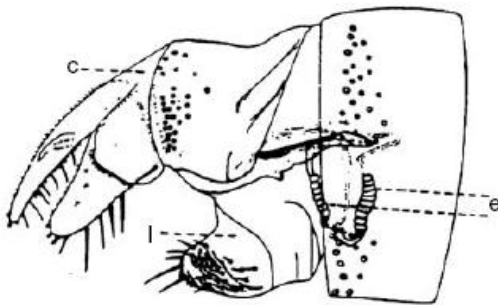


Figura 6. Extremo abdominal de la hembra de flebotomo y detalle de las espermatecas (tomado de Killick-Kendrick, 1999).

En los machos (Figura 7), los segmentos 7° y 8° están reducidos y los segmentos 9° y 10° están muy modificados y desarrollados, conformando el aparato copulador o genitalia. Se distinguen un par de apéndices voluminosos y articulados, formados por un segmento basal (coxito) y un segmento apical (estilo), un par de apéndices que nacen a nivel de los coxitos (parámetros), un par de prolongaciones basales (surestilos o lóbulos basales) y un par de láminas membranosas, soldadas en la cara interna de los surestilos, los cercos. El aparato genital interno comporta la presencia de dos testículos, dos canales deferentes, una vesícula seminal y un canal eyaculador que desemboca en un órgano fuertemente quitinizado, la pompa genital, de donde parten los filamentos genitales que van a parar a la correspondiente valva peniana del aedeago.

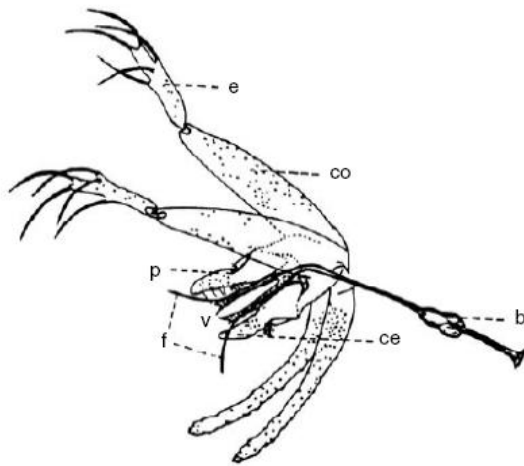


Figura 7. Extremo abdominal del macho de flebotomo (tomado de Killick-Kendrick, 1999).

I.1.2.- BIOLOGÍA Y ETOLOGÍA DE LOS FLEBOTOMOS

Los flebotomos son insectos holometábolos, sufriendo una metamorfosis completa que incluye las fases de huevo, cuatro estadios larvarios, una de pupa y las formas de adultos, macho y hembra (Figura 8). Cada especie de flebotomo posee una biología compleja y propia que incluye los procesos de reproducción, modo de alimentación, dispersión y las otras actividades que inciden directamente sobre su papel vectorial y la lucha antivectorial (Killick-Kendrick, 1999; WHO, 2012).

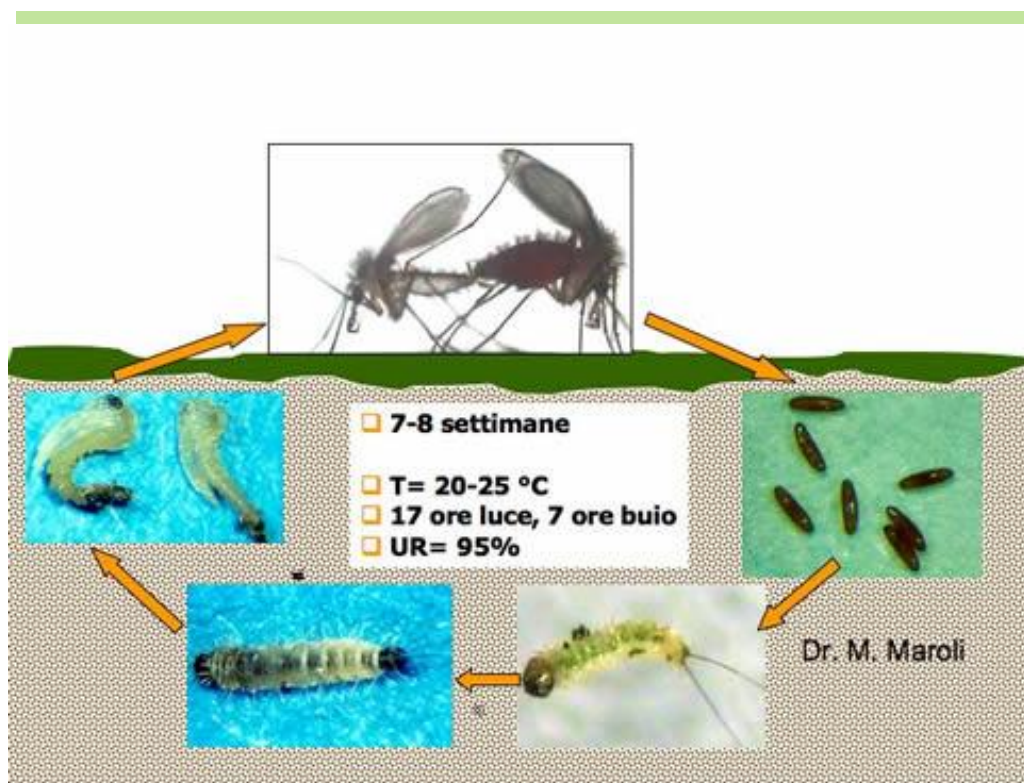


Figura 8. Ciclo biológico esquemático de los flebotomos (Imagen del Dr. M. Maroli. <http://www.gruppoleishmania.org/es/ciclo-biol%C3%B3gico-del-flebotomo-0>)

En las zonas templadas, la disminución de la temperatura en el periodo otoñal, junto con los cambios que se producen respecto al fotoperiodo, a diferentes rangos dependiendo de la altitud y la latitud, inducen a una diapausa, en general, bajo el cuarto estadio larvario (Dolmatova y Demina, 1971; Léger y Depaquit, 1999; Lewis y Ward, 1987; Ready y Croset, 1980). Para algunas especies de áreas más calientes la diapausa tiene lugar bajo el estadio de huevo. El desarrollo larvario tiene lugar a una temperatura constante de unos 28°C (Abonnenc, 1972). También la fluctuación de los periodos de lluvias y la topografía inciden en la instauración de la diapausa (Lewis y Ward, 1987). Los adultos vuelven a emerger cuando incrementa la temperatura en el periodo estival.

El número anual de generaciones depende de la duración de la estación cálida; cuanto más larga sea ésta más generaciones aparecen. Para la mayor parte de las especies paleárticas, existen de una a tres generaciones anuales, pudiendo variar el número de éstas para una misma especie en función de la latitud. La emergencia de una generación viene marcada por la ascensión brusca de la proporción de hembras que no han efectuado ninguna puesta de huevos (núlíparas) frente a aquellas que ya han efectuado alguna oviposición (paridas) (Léger y Depaquit, 1999).

Las hembras efectúan la puesta de los huevos en sitios arenosos, en penumbra, con humedad relativa alta, temperatura constante y ricos en material orgánico, como las deposiciones de animales o detritus vegetales, para que las larvas que eclosionen queden protegidas de la desecación y puedan alimentarse (Abonnenc, 1972; Goddard, 2000). Esto hace que las formas juveniles de los flebotomos sean desconocidas para muchas especies así como los biotopos en que se encuentran en condiciones naturales (Felicangeli, 2004; Léger y Depaquit, 1999).

Los adultos permanecen en reposo en lugares abrigados y próximos a los hospedadores vertebrados necesarios para efectuar la ingesta de sangre, tales como agujeros de los árboles, madrigueras de animales, termiteros, nidos de pájaros, oquedades de muros y suelos, cuevas y bajo la vegetación. También se encuentran en habitaciones humanas (letrinas, fisuras de las paredes, etc.) (Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 1999). El hábitat puede variar en función de si se trata de hembras que tienen que alimentarse a partir del hospedador vertebrado o de hembras que necesitan, temporalmente, de un lugar tranquilo para la maduración de los huevos o bien de hembras que deben, finalmente, efectuar la deposición de dichos huevos (Abonnenc, 1972). Algunos

biotopos, como las madrigueras de roedores, pueden reunir las tres condiciones de lugar de alimentación, maduración y puesta de los huevos.

Ambos sexos requieren un aporte externo de carbohidratos para su supervivencia. (Killick-Kendrick, 1978). Además, la mayoría de las hembras requieren de uno o más aportes sanguíneos para la maduración de los huevos; sin embargo, existen especies autógenas. La picada es telmófaga (Izri y col., 2006). Las hembras efectúan la ingesta sanguínea de mamíferos, pájaros, reptiles o batracios, dependiendo de las especies. Cuando se acercan a picar lo hacen en silencio, a diferencia de los mosquitos. Las especies que pican al hombre son en general igualmente zoófilas. Cuando se analiza el contenido estomacal de un flebotomo no es raro el encontrar una mezcla de sangres de origen distinto. Ello es debido a que cuando se molesta a un flebotomo durante el ejercicio de la ingesta ésta suele interrumpirse, existiendo la posibilidad de reanudarla en el mismo hospedador o en otro diferente. Para que una hembra llene su intestino completamente se necesita entre 30 segundos a 5 minutos (Léger y Depaquit, 1999).

La mayoría de las especies antropofílicas presentan una actividad crepuscular o nocturna, cuando la temperatura desciende (19-20°C) y la humedad relativa aumenta, momento en que salen de sus lugares de reposo para ir a alimentarse (Léger y Depaquit, 1999). Son muy sensibles al viento, no saliendo de sus lugares de reposo si las condiciones no son favorables (límite: 1m/seg.) (Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 1999). Son malos voladores, por lo que no suelen desplazarse a más de 1 Km, aunque alguna especie se ha encontrado a unos 2 Km de distancia (Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 1999). El vuelo es silencioso y su desplazamiento vertical lo efectúan a modo de pequeños saltos, de abajo hacia arriba, sobre paredes y frecuentemente a baja altitud (Abonnenc, 1972; Léger y Depaquit, 1999). El desplazamiento horizontal es más lento, rectilíneo y, en general, de una duración más larga (Abonnenc, 1972).

Algunas especies se encuentran en el ambiente doméstico, denominadas endofílicas, mientras que otras, la mayoría, se encuentran claramente alejadas de dichos ambientes domésticos (exofílicas). Este comportamiento puede cambiar para una misma especie en distintas áreas geográficas y no todas las especies que presentan un hábitat endofílico pican en el interior de las habitaciones (endofágicas). El conocimiento de la biología de estos vectores es de particular importancia para la lucha antivectorial (Alexander y

Maroli, 2003; Croft y col., 2006; Killick-Kendrick, 1999; Maroli y col., 2013; Ready 2010).

I.1.3.- IMPORTANCIA SANITARIA DE LOS FLEBOTOMOS

Los flebotomos son importantes como vectores de distintas enfermedades originadas por bacterias, virus y protozoos (Abonnenc, 1972; Alexander y Maroli, 2003; Goddard, 2000; WHO, 2012). Entre ellas se encuentran las leishmaniosis causadas por protozoos pertenecientes al género *Leishmania* (Alvar y col., 2004; Izri y col., 2006; Lucientes y col., 2005; WHO, 2012).

De los 13 géneros de flebotomos descritos tan sólo los géneros *Phlebotomus*, presente en el Viejo Mundo, y *Lutzomyia*, presente en el Nuevo Mundo, incluyen especies implicadas en la transmisión de las leishmanias. Dicha transmisión corre a cargo de las hembras, único estadio evolutivo que es hematófago (Dedet y Pratlong 2003; Izri y col., 2006; Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008).

Después de la puesta de huevos, la hembra busca un nuevo hospedador para realizar otra ingesta sanguínea y así sucesivamente, repitiendo los ciclos gonotróficos cada 6-10 días, lo que le posibilita la transmisión de los agentes patógenos a lo largo del aproximadamente mes de su vida (Killick-Kendrick, 1978, 1999).

Para *L. infantum*, la especie presente en el área mediterránea, se han citado como vectores a distintas especies del género *Phlebotomus*, fundamentalmente del subgénero *Larroussius* (Tabla 1).

ESPECIE DE FLEBOTOMO	DISTRIBUCIÓN
★ Subgénero <i>Larrousius</i>	
<i>P. ariasi</i>	Andorra, Argelia, España, Francia, Italia, Marruecos, Portugal, Túnez.
<i>P. perniciosus</i>	Andorra, Alemania, Argelia, Bulgaria, Croacia, España, Francia, Italia, Malta, Marruecos, Mónaco, Portugal, Suiza, Túnez.
<i>P. longicuspis</i> *	Argelia, Marruecos, Túnez.
<i>P. langeroni</i>	Egipto, España, Francia, Túnez.
<i>P. perfiliewi</i>	Albania, Argelia, Bosniahersegovina, Croacia, Chipre, Francia, Georgia, Grecia, Hungría, Israel, Italia, Malta, Marruecos, Montenegro, Palestina, República de Macedonia, Rumania, Serbia, Túnez, Turquía, Ucrania.
<i>P. neglectus</i>	Albania, Chipre, Croacia, Grecia, Kosovo, Hungría, Italia, Eslovenia, Malta, Montenegro, República de Macedonia, Rumania, Serbia, Turquía, Ucrania.
<i>P. kandelakii</i>	Afganistán, Armenia, Azerbaiyán, Georgia, Irán, Transcaucasia
<i>P. smirnovi</i>	China, Kazajstán.
<i>P. tobbi</i>	Albania, Croacia, Chipre Grecia, Iran, Israel, República de Macedonia, Siria, Turquía.
★ Subgénero <i>Adlerius</i>	
<i>P. chinensis</i>	China.
<i>P. longiductus</i>	Kazajstán, Kirguistán, Ucrania, Uzbekistán.

Tabla 1. Especies de flebotomos vectoras probadas o sospechosas* de la transmisión de *Leishmania infantum* en el Viejo Mundo (basado en Croset y col., 1978; Killick-Kendick, 1999; Maroli y col., 2013 Ready, 2010; www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/sandflies/Pages/sandflies.aspx).

A pesar de que la primera descripción de un flebotomo del subgénero *Larrousius*, *Phlebotomus perniciosus*, la hizo Newstead en 1911 en la isla de Malta, tuvieron que pasar algunos años hasta que se le relacionó con la leishmaniosis, cuando distintos autores lograron infectar hembras de esta especie después de ser alimentadas sobre un perro con leishmaniosis visceral (Adler y Theodor, 1930; Parrot y col., 1930). En España el aislamiento del parásito ha demostrado el papel vectorial tanto de *P. ariasi* como de *P. perniciosus* (Guilvard y col. 1996; Lucientes y col., 1988; Molina y col., 2005; Rioux y col., 1986). Además, otros estudios han permitido detectar la presencia de ADN de *Leishmania* en *P. perniciosus* (Durán-Martínez y col., 2011; Jiménez y col., 2013; Martín-Sánchez y col., 2006).



Figura 9. Hembra de *P. perniciosus* alimentada (Izri y col. 2006)

Cuando las hembras de los flebotomos pican para ingerir la sangre del hospedador (Figura 9), y en el caso de que las leishmanias lleguen a un vector susceptible, los flebotomos se infestan si la sangre contiene macrófagos o monocitos infestados con las formas amastigotes de las leishmanias en el interior de las vacuolas lisosomales. La disminución de la temperatura y el aumento del pH que sufren los parásitos al pasar del mamífero al flebotomo desencadena el desarrollo del parásito en el vector (Bates, 2007; Bates y Rogers, 2004; Ponte-Sucre, 2013) en cuyo intestino los amastigotes sufren una compleja serie de transformaciones morfológicas y funcionales que comporta la diferenciación de los promastigotes procíclicos que se multiplican. Éstos maduran a promastigotes metacíclicos o infectivos que, al ser incapaces de fijarse a la pared del intestino, se dirigen hacia las regiones bucales donde bloquean la faringe de los flebotomos. Las hembras de los flebotomos que contienen los promastigotes metacíclicos, vehiculan éstos en una nueva picadura al hospedador vertebrado (de

Almeida y col., 2003; Bates, 2007; 2008; Dostálová y Volf, 2012; Kamhawi, 2006) (Figura 10). El ciclo se desarrolla en unos 6-9 días (Kamhawi, 2006).

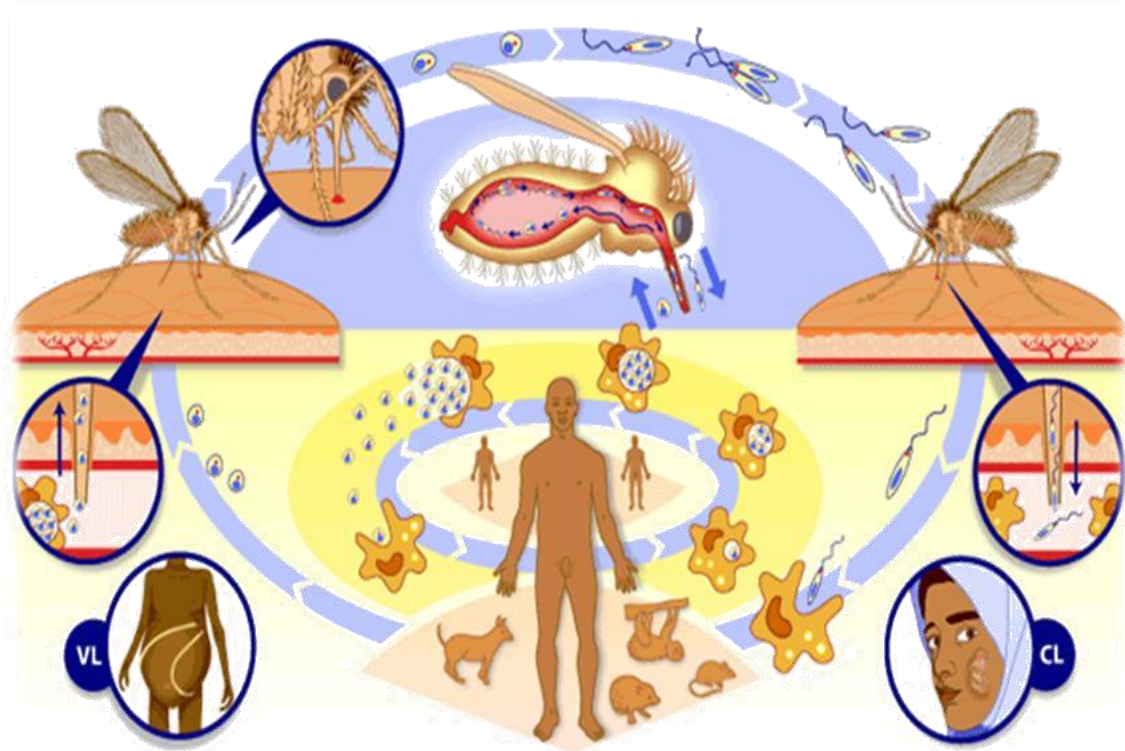


Figura 10. Ciclo biológico de las leishmanias (<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>)

La eficacia vectorial dependerá de varios factores tales como la probabilidad de supervivencia por parte del vector y sus hábitos alimenticios (origen de la sangre ingerida, frecuencia de alimentación, otras fuentes de alimentación,...) (Gállego, 1997; Killick-Kendrick y col., 1979; Lewis y Ward 1987; Molyneux y Killick-Kendrick, 1987). También el particular comportamiento que presentan algunas hembras de flebotomos parasitadas, al intentar picar varias veces al hospedador sano, incrementa el riesgo de transmisión de la leishmaniosis (Killick-Kendrick, 1999). En todo caso, para que las leishmanias puedan ser vehiculadas, tras la ingesta de sangre infestada de un mamífero parasitado, los parásitos deben completar el ciclo biológico en el vector, multiplicándose y evolucionando, y alcanzar las piezas bucales.

Existen dos trabajos publicados que hacen referencia a las temperaturas a las cuales tendría lugar el ciclo biológico de *L. infantum* en los vectores, *P. perniciosus* y *P.*

ariasi. Rioux y col. (1985), obtienen un incremento significativo de formas parásitas en la válvula estomodeal de *P. ariasi* al aumentar la temperatura de 10 a 20°C para estabilizarse entre 20 y 25°C. Hlavacova y col. (2013) no encuentran diferencias al estudiar el desarrollo de las leishmanias en *P. perniciosus*, pero en su estudio solo comparan el desarrollo de dicho ciclo a las temperaturas de 20 y 26°C. Dichos autores sugieren que existe un cierto riesgo de transmisión de *L. infantum* por *P. perniciosus*, y de extensión de la leishmaniosis, a altitudes y latitudes más elevadas dado el desarrollo rápido del parásito en dicho vector a temperaturas de 20°C, 8 días post ingesta sanguínea. En cultivo en el laboratorio tanto *P. ariasi* como *L. infantum* no resisten Temperaturas >30°C e <5°C (Rioux y col., 1985).

I.1.3.1. Incriminación de las especies vectoras

El control y la profilaxis de las enfermedades trasmisibles, como la leishmaniosis, se lleva a cabo en muchos casos apoyándose en el control de los artrópodos vectores. Dado que no todas las especies de flebotomos presentan un papel vectorial en la transmisión de las leishmanias, que en un foco se puede encontrar más de una especie vectora, actuando en condiciones simpátricas, y que la etiología de las especies puede variar en diferentes áreas geográficas, es fundamental la realización de estudios que conlleven la investigación e incriminación de los vectores en un área determinada así como del particular comportamiento de las especies vectoras en las diferentes áreas endémicas.

En la mayoría de los trabajos epidemiológicos publicados hasta la fecha, la incriminación de los flebotomos vectores ha sido efectuada tras la observación, y a menudo aislamiento, del parásito en el estómago del insecto infestado en condiciones naturales, después de su estudio con una lupa estereoscópica (Guilvard y col., 1996; Lucientes y col., 1988; Pires, 1984; Rioux y col., 1986; Rossi y col., 2008; Ryan y Brazil, 1984). Esta metodología clásica es lenta y conlleva el estudio de un gran número de ejemplares. Además de ser muy laboriosa, presenta una baja sensibilidad y no distingue entre diversas especies de tripanosomátidos.

Últimamente, se han aplicado técnicas moleculares (PCR anidada, ELISA-PCR, PCR a tiempo real) al estudio de los flebotomos vectores de las leishmanias, con el fin de disponer de datos acerca del índice de parasitación en distintos focos de leishmaniosis (Jiménez y col., 2013; Martín-Sánchez y col., 2006; Rossi y col., 2008; Saraiva y col., 2010; Velo y col., 2005; Volf y col., 2008). Las mayores ventajas que presentan estas

técnicas son su sensibilidad, la ausencia de interferencias de otros organismos y la automatización de la mayoría de las etapas, aunque presentan el inconveniente del riesgo de contaminación de las muestras y la necesidad de infraestructura especializada. Además, se corre el peligro de incriminar como vectores a especies de artrópodos que hayan realizado una ingesta sanguínea de un animal parasitado, detectándose ADN del parásito debido a la elevada sensibilidad de la técnica, sin que se produzca el ciclo completo de las leishmanias en su interior y, por lo tanto, carecen de papel vectorial y de importancia epidemiológica. Entre otros artrópodos, se ha señalado a garrapatas, pulgas, ceratopogónidos, entre otros en distintos países de Europa y Sudamérica (Antoniou y col., 2013; Campino y col., 2013; Coelho y Bresciani, 2013; Dantas-Torres 2011; de Morais y col., 2013; Dougall y col., 2011; Nzelu y col., 2014; Slama y col., 2014; Solano-Gallego y col., 2012; Trotta y col., 2012).

I.2.- LAS LEISHMANIOSIS

Las leishmaniosis son un conjunto de protozoosis de distribución cosmopolita, estando únicamente ausentes de la Antártida (Gállego, 2004). Pigott y col. (2014) revisan la distribución de las leishmaniosis. La padecen 350 millones de hombres, mujeres y niños en todo el mundo (Alvar, y col., 2012; WHO, 2012). En los últimos años, se viene considerando a la leishmaniosis como una enfermedad emergente y/o re-emergente junto a otras que están también transmitidas por artrópodos (Ashford, 2000; Desjeux, 2001). Así, si bien se consideraban ausentes de Australia, recientemente se han detectado casos autóctonos, en canguros, en este país (Rose y col., 2004).

Están causadas por diferentes especies de protozoos flagelados, kinetoplástidos tripanosomátidos, del género *Leishmania*. Éste comprende 2 subgéneros: *Leishmania* y *Viannia* (Bañuls y col., 2007), que incluyen 17 complejos filogenéticos (Rioux y col., 1990; Thomaz-Soccol y col., 1993a; Thomaz-Soccol y col., 1993b) y son responsables de las leishmaniosis en el hombre y otros mamíferos.

Existen unas 20 especies de *Leishmania* que afectan al hombre (Bañuls y col., 2007; 2011; Desjeux, 1996; Schönian y col. 2008). En los países europeos occidentales de la cuenca mediterránea se ha identificado, con carácter endémico, una única especie de *Leishmania*, *L. infantum*, que es responsable a su vez de las formas humanas y caninas de la leishmaniosis (Gállego, 2004; Gramiccia y Gradoni, 2005; Moreno, 1989).

La leishmaniosis por *L. infantum* presente en la región mediterránea sigue el ciclo epidemiológico secundario de Garnham (1965) de tipo zoonótico, con el perro como hospedador principal y reservorio del parásito y el hombre como hospedador secundario (Dereure 1999, Gállego, 2004, Gramiccia y Gradoni, 2005).

Existen datos evidentes de que la leishmaniosis por *L. infantum* es prevalente únicamente en las zonas con temperaturas que van entre 5-10 °C en Enero y 20-30 °C en Julio. Ello sugiere que la temperatura es uno de los principales factores que previene la expansión de la enfermedad hacia zonas del norte de Europa (Kuhn, 1999). Se trata de regiones en que las temperaturas medias invernales difieren considerablemente de las estivales.

Con cada picadura de los flebotomos infestados entran en la dermis del hospedador vertebrado entre 10 y 200 promastigotes metacíclicos, algunos de los cuales son destruidos por los leucocitos y eosinófilos, mientras que otros son englobados en una vacuola parasitófora en el interior de los macrófagos. Aquí, el parásito se transforma en forma amastigota y se divide activamente hasta que dicho macrófago estalla. Los parásitos se liberan e invaden otros macrófagos vecinos en el interior de los cuales siguen multiplicándose. Desde aquí se diseminan a través de la piel o del torrente sanguíneo y linfático por órganos ricos en células macrofágicas como son la médula ósea, el hígado y el bazo principalmente (de Almeida y col., 2003; Sacks 2001) (Figura 10). Ello conlleva a la aparición de tres formas clínicas principales: leishmaniosis cutánea, leishmaniosis mucocutánea y leishmaniosis visceral (Dedet y Pratlong, 2003; Murray y col., 2005; WHO, 2012).

Las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad vienen determinadas por la interacción entre el parásito y el hospedador vertebrado. Factores como la predisposición genética del hospedador, el estado nutricional e inmunitario del hospedador, el tipo de respuesta inmune, la especie y/o cepa de *Leishmania*, la distinta sensibilidad a la temperatura corporal de las leishmanias, el lugar de la picada del flebotomo, los componentes de la saliva del flebotomo, entre otros, influirán en el tipo de manifestación clínica (Bates y Rogers 2004; Dedet y Pratlong, 2003; Gállego, 2004; Griffiths, 1987; Maroli y col., 2013; Martín-Martín y col., 2013; Ponte-Sucre, 2013; Ready, 2013; Rees y Kager 1987; Rohoušová y Volf, 2006).

En nuestros focos se presentan principalmente dos formas clínicas de la leishmaniosis en el hombre: la leishmaniosis cutánea y la leishmaniosis visceral. Los casos de

afectación de las mucosas (leishmaniosis mucocutánea) son raros (Alvar y col., 1997). En cambio, en el perro se suelen presentar signos clínicos de afectación cutánea y visceral de forma concomitante (Dereure, 1999; Gállego, 2004; Miró y Molina, 2006).

La lesión típica de la leishmaniosis humana cutánea comienza en forma de nódulo en el lugar de la inoculación. En el centro se forma una costra que puede desprenderse, exponiendo una úlcera que se cura gradualmente y deja una cicatriz ligeramente hundida con pigmento alterado (Dedet y Pratlong 2003; WHO, 2012).

La leishmaniosis visceral en el hombre cursa con hepato-esplenomegalia, linfadenopatías, dolor abdominal, pérdida de peso, cansancio, fiebre irregular, palidez de las mucosas, anemia y pancitopenia, con mal pronóstico en la mayoría de los pacientes no tratados.

La leishmaniosis canina presenta un periodo de incubación que oscila entre dos a doce meses. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo muestran la existencia de un gran porcentaje de perros asintomáticos (Ballart y col. 2013, Fisa y col. 1999; Gálvez y col. 2010b; Miró y col., 2011; Morales-Yuste y col., 2012; Solano-Gallego y col., 2001), aun cuando éstos son infectivos para los vectores (Molina y col., 1994). Los que evolucionan a la enfermedad, pueden manifestar una gran variedad de síntomas, incluyendo de forma concomitante síntomas cutáneos y viscerales. Los signos clínicos más comunes son lesiones cutáneas (alopecia, dermatitis, úlceras cutáneas, onicogriposis), signos oculares (conjuntivitis, queratoconjuntivitis, blefaritis, uveítis), y de afectación visceral (fiebre, linfadenopatía local o generalizada, pérdida de peso progresiva, pérdida del apetito, anemia, hepato-esplenomegalia, glomerulonefritis y fallo renal crónico) (Alvar, y col., 2004; Baneth y col., 2008; Bourdeau y col., 2014; Dereure, 1999; Gállego, 2004; Lombardo y col., 2014; Moreno y Alvar, 2002; Solano-Gallego y col., 2009; 2011).

I.3.- ANTECEDENTES DE LOS FLEBOTOMOS Y DE LAS LEISHMANIOSIS EN LAS ISLAS BALEARES

Los datos acerca de los flebotomos y las leishmaniosis en las Islas Baleares son escasos y focalizados. Se incluyen aquí los antecedentes acerca de los flebotomos, así como de las leishmaniosis humana y canina, en dichas islas.

I.3.1.- LOS FLEBOTOMOS DE LAS ISLAS BALEARES

Existen pocos estudios entomológicos acerca de los flebotomos de las islas Baleares, estando focalizados la mayoría de ellos en la isla de Mallorca.

El primero de los trabajos fue llevado a cabo por Pittaluga y de Buen (1918) quienes detectan la presencia de *Phlebotomus perniciosus*, *P. papatasi* y *S. minuta* en Mallorca, concretamente en Palma de Mallorca. Más tarde, 2 de estas especies (*P. perniciosus* y *S. minuta*) eran localizadas en Palma de Mallorca, Felanitx, Port d'Andratx y Porto Cristo (Mallorca) (Zariquiey, 1944).

Después de muchos años sin datos en la zona, Gil Collado (1977) recoge en unos mapas la distribución de estas 3 especies en España, además de otras, incluyendo las islas Baleares, sin hacer distinción entre islas aunque todo parece indicar que hace referencia exclusivamente a Mallorca.

Más de 10 años más tarde, Gil Collado y col. (1989) realizan un trabajo de recopilación de la distribución de los flebotomos en España y recogen la presencia de *P. ariasi* en Mallorca, sin mencionar quien lo captura ni el lugar concreto de procedencia, además de las otras 3 especies antes mencionadas.

En el año 1990 se publican los resultados de un trabajo más extensivo de la presencia de los flebotomos en la isla de Mallorca (Lladó y Rotger, 1990). En este trabajo, que incluye los resultados de la identificación de tan solo un 20%, aproximado, de los flebotomos capturados en puntos focalizados de la isla en los años 1987 y 1989, se cita la presencia de *P. perniciosus*, *P. sergenti* y *S. minuta*, sin que se mencione la captura de *P. ariasi*.

Los primeros datos acerca de la presencia de flebotomos en Menorca datan de 1989, quedando recogida la presencia de *P. perniciosus*, *P. sergenti* y *S. minuta* en la isla

(Seguí y col., 1989). Más tarde, Seguí presenta su memoria de Tesis Doctoral y publica los resultados obtenidos de los estudios efectuados durante los años 1988 y 1989, no habiéndose modificado la composición cualitativa de los flebotomos de Menorca (Seguí, 1991a, b, c). El estudio fenológico muestra que *S. minuta* y *P. perniciosus* son activos desde finales de Abril-principios de Mayo hasta mediados de Diciembre. El estudio de la ingesta de sangre de *P. perniciosus* mostró que se alimenta de distintas especies animales presentes en la isla (hombre, perro, gato, buey, conejo, ratón), manifestando un carácter oportunista, aunque con una cierta preferencia por el hombre y el perro (de Colmenares y col., 1995; Seguí, 1991b, c).

Con respecto a los flebotomos de Ibiza y Formentera, Molina y col. (2005) publican los resultados de un estudio efectuado en los meses de Junio y Julio de los años 2003 y 2004 en el que realizan capturas de flebotomos con trampas luminosas tipos CDC. Identifican la presencia de tres especies del género *Phlebotomus*, *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi*, esta última sólo en la isla de Ibiza, y a *S. minuta*. El estudio del parasitismo mostró que *P. perniciosus* presentaba una tasa de parasitación por leishmanias del 0,96% y 0,55% en Ibiza y Formentera, respectivamente.

Alvar (2001) presenta una actualización del mapa de distribución de las especies de flebotomos en España, en el que continúan apareciendo en Mallorca las mismas cuatro especies citadas por Gil Collado y col. (1989), incluyendo a *P. ariasi*.

Los últimos trabajos en los que se incluyen datos acerca de la distribución de los flebotomos en España, incluyendo las Baleares, datan de 2005 (Lucientes y col., 2005) y 2012 (Amela y col., 2012; Suárez y col., 2012). En ellos se recogen los mismos mapas de distribución de algunas especies del género *Phlebotomus*, entre ellas *P. ariasi* y *P. perniciosus*, aunque la distribución de éstos está rotulados de manera distinta. Así, según Lucientes y col., (2005) *P. ariasi* estaría presente en todas las Islas Baleares, mientras que *P. perniciosus* tan sólo en Mallorca, mientras que en los mapas de Amela y col. (2012) y Suárez y col. (2012), la distribución sería al revés. Probablemente existe un error en la rotulación de los mapas de Lucientes ya que, como se desprende de la revisión efectuada, *P. perniciosus* presenta una distribución geográfica más amplia en las Baleares.

I.3.2.- LA LEISHMANIOSIS HUMANA DE LAS ISLAS BALEARES

La primera descripción de un caso de leishmaniosis en las Islas Baleares data de 1925, tratándose de una leishmaniosis visceral de la isla de Mallorca (Pittaluga, 1925). En el año 1926 se cita un caso diagnosticado por los doctores Cervera y Darder también en Mallorca (Seguí, 1991a) y en el año 1935, el Dr. Nájera Angulo recoge, en un informe sobre leishmaniosis visceral y cutánea en España, tres casos observados en Mallorca entre 1925 y 1934 por el Dr. Cervera, sin que quede reflejado en dicho informe el caso de Pittaluga.

Por último, Gil Collado (1977) recoge los datos de los servicios dermatológicos en el periodo comprendido entre 1961 y 1973, en el que sólo se recoge un caso de leishmaniosis cutánea en el año 1973.

El primer caso de leishmaniosis humana que hemos podido encontrar que se haya recogido de forma oficial data de la semana del 5-11 de septiembre de 1982 (Boletín epidemiológico, 5 – 11 Septiembre, 1982), dado que la leishmaniosis humana se recoge como Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en España desde el año 1982 hasta el año 1996. A partir de ese momento (Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre), pasa a ser considerada como enfermedad endémica de distribución regional y son las Comunidades autónomas que tienen transferidas competencias de salud quienes deciden si la mantienen o no en su listado de enfermedades de declaración obligatoria. La Conselleria de Salut del Govern de les Illes Balears consideró, por su endemismo, a la leishmaniosis como una “Malaltia de Declaració Obligatòria” (MDO), de declaración numérica e individual (*Decret 15/1997, de 23 de gener*, por el que se crea y regula la *Xarxa de Vigilància Epidemiològica en la Comunitat Autònoma de les Illes Balears*). Recientemente, la Secretaría General de Sanidad y Consumo del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad de España ha publicado con fecha 26 de Noviembre de 2013 el Proyecto de Orden por el que se modifican los Anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995. Adaptándose a los cambios observados en el patrón epidemiológico de las enfermedades transmisibles, la leishmaniosis aparece citada en el anexo I y en el anexo II se la reconoce como enfermedad de declaración semanal a nivel nacional y de la que se deben aportar los datos epidemiológicos básicos.

Desde 1982 hasta 1996, en que la leishmaniosis humana se declara a nivel nacional por parte del sistema sanitario del Gobierno español, la declaración en las Islas Baleares se recoge de forma global, sin diferenciar entre islas (Tabla 2).

Año	Número de casos declarados en las Islas Baleares (tasa/10⁵habitantes)
1982	1
1983	1
1984	2
1985	3
1986	4 (0,55)
1987	0
1988	9 (1,18)
1989	8 (1,03)
1990	11(1,38)
1991	6
1992	22
1993	5
1994	5
1995	7
1996	1

Tabla 2. Casos de leishmaniosis humanos declarados de forma oficial en las Islas Baleares (datos elaborados a partir de los casos recogidos en los Boletines Epidemiológicos Semanales del Ministerio de Sanidad y Consumo (1982 – 1996).

El Gobierno Autónomo de les Illes Balears no recoge datos epidemiológicos oficiales de la leishmaniosis humana hasta el año 2002, en que ya se separan los casos por islas, agrupándose Ibiza y Formentera (Pitiusas) (Tabla 3). Los últimos datos de que se dispone son los del año 2013.

Año	Mallorca	Menorca	Pitiusas	Total	IEA	Tasa global
2002	2	0	1	3	-	-
2003	10	0	0	10	-	-
2004	17	0	3	21**	3,50	-
2005	36	0	0	36	6	-
2006	33	0	1	35**	-	3,5
2007	19	0	2	22**	-	2,1
2008	11	0	0	11	-	1
2009	11	*	3	14	-	1,3
2010	7	0	1	8	0,36	0,7
2011	17	1	2	20	1,43	1,8
2012	18	0	2	20	1,43	1,8
2013	14	0	2	16	1,14	1,4
2002-13	195	1	17	214	-	-

Tabla 3. Casos de leishmaniosis humanos declarados de forma oficial en las Islas Baleares (datos elaborados a partir de los casos recogidos en los Fulls de Vigilancia Epidemiològica (2002-2005, 2013) y los Informes Anuales (2006-2012))

IEA: Índice Epidemiológico Acumulado

Tasa global: número de casos/100.000habitantes

*Se menciona que continúan sin declararse casos en Menorca

**Un caso no tiene isla asignada

En el año 2005 en el Full de Vigilància Epidemiològica 39/2005, se recoge la serie histórica desde 1982 hasta el 2004 (Figura 11 a y b), en que se observa una tasa de incidencia baja al principio del periodo y un aumento importante a finales de los años 80 y oscilaciones en los años sucesivos.

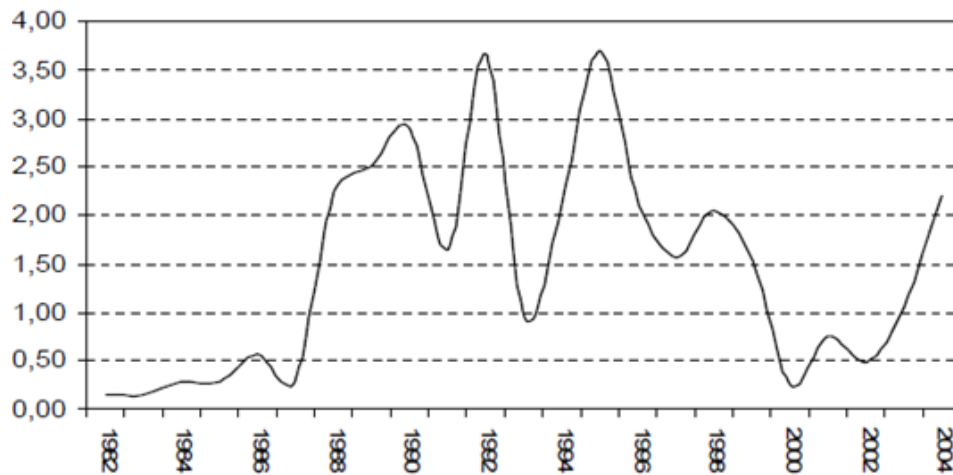


Figura 11a. Leishmaniosis en las Islas Baleares. Evolución de la tasa de incidencia 1982 – 2004. Tasa por 100.000 habitantes (Tomado de Full de Vigilància Epidemiològica 39/2005)

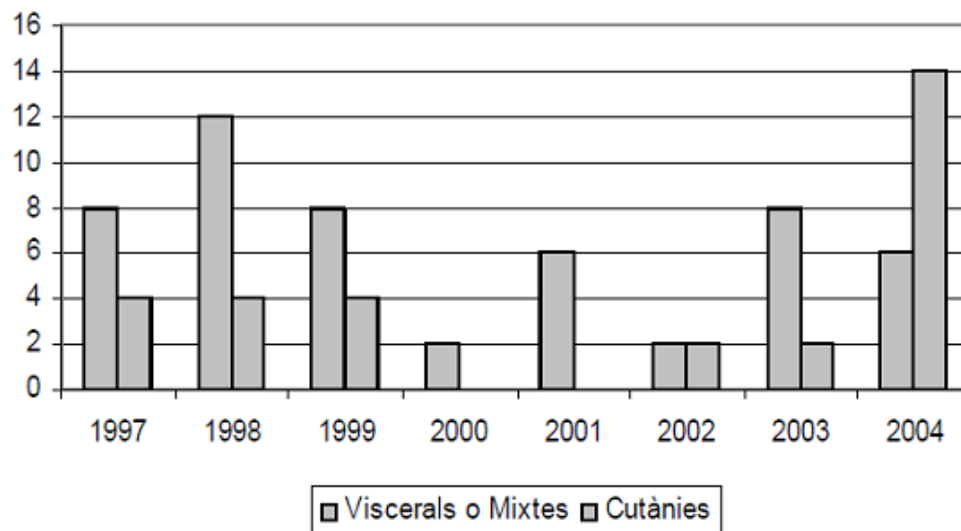


Figura 11b. Leishmaniosis en las Islas Baleares, 1997 – 2004. Evolución de los casos de leishmaniosis según la forma clínica (Tomado de Full de Vigilància Epidemiològica 39/2005)

La serie histórica desde el 2003 hasta el 2012 (figura 12), muestra un incremento de los casos, fundamentalmente cutáneos, hasta el año 2006 en que van descendiendo hasta el 2010, a partir del cual se vuelve a producir un ligero incremento. En la práctica totalidad de este periodo, las formas viscerales son inferiores a los casos cutáneos. Todos los casos declarados se han comunicado como esporádicos, sin que se haya detectado ninguna agrupación en forma de brote.

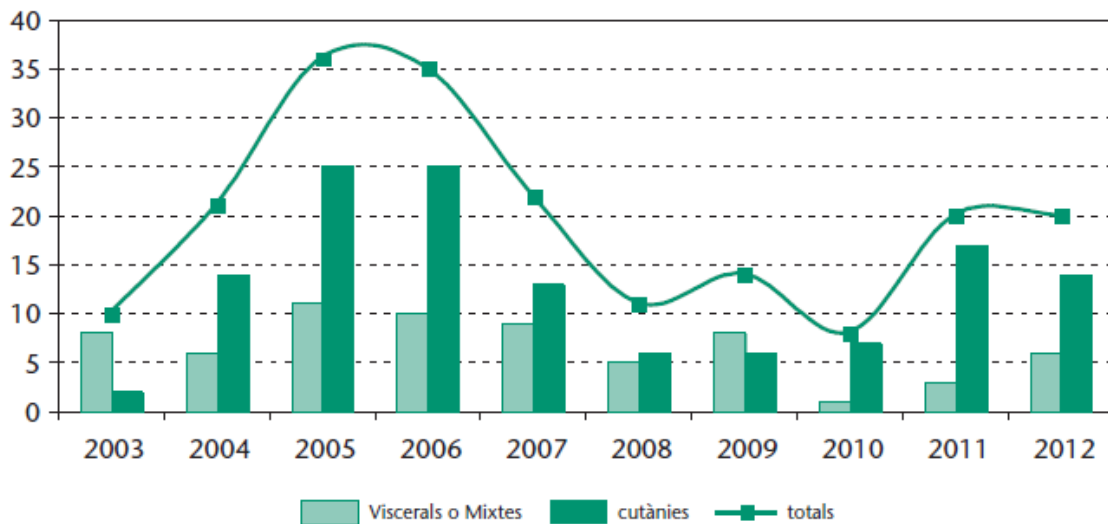


Figura 12. Leishmaniosis en las Islas Baleares, 2003 – 2012. Evolución del número de casos por tipo de leishmaniosis. (Tomado de Xarxa de Vigilància Epidemiològica de les Illes Balears. Informe 2012. Editado por el Govern de les Illes Balears en Noviembre del 2013)

En alguna serie anual, los casos de leishmaniosis humana recogidos fueron detectados a través de búsqueda activa; así, 6 de los 20 casos recogidos del año 2012 no fueron notificados por el médico.

En cuanto a las variables de riesgo recogidas en el protocolo de notificación se puede destacar que de los 221 casos de leishmaniosis detectados desde 1999, 63 (28%) se notificaron con serología positiva a VIH. Para las 86 formas viscerales o mixtas acumuladas los positivos a VIH son 51 (60%) (Xarxa de Vigilància Epidemiològica de les Illes Balears, 2013). Solamente en 4 casos del 2012 se constataba la presencia de algún factor de riesgo ambiental (mosquitos, perros, etc.).

Tal y como puede observarse, la mayoría de casos de leishmaniosis humana han sido declarados en la isla de Mallorca (91%). Tan sólo en el año 2011 se recoge un caso de leishmaniosis cutánea en la isla de Menorca. Después de hablar con el dermatólogo, Dr. J. Abellán, pudimos constatar que se trataba de un caso en un niño de 11 meses que había viajado a Ibiza, por lo que podría tratarse de un caso introducido. De hecho, esta posibilidad ya había sido mencionada anteriormente con otros tres casos de leishmaniosis humana detectados en Menorca.

Seguí (1991a) realiza una búsqueda de casos de leishmaniosis humana en Menorca, recogiendo dos en el Hospital Virgen de Monte Toro (Mahón). Uno de ellos era del año 1983 de una mujer de 23 años, de origen menorquín pero residente en Almería, diagnosticada de leishmaniosis visceral. El otro caso, una leishmaniosis cutánea, se diagnosticó en un varón que había residido durante cierto tiempo en Valencia. Los dos casos se consideraron como importados.

Portús y col. (1994) hacen mención de un caso de leishmaniosis visceral que tuvo lugar en 1991 en una mujer de 44 años que hacía 13 años que no había salido de la isla. Su último viaje había sido en 1978 a la Costa Brava. Se sugirió la posibilidad de una reactivación de una forma críptica de la leishmaniosis adquirida 13 años antes. Según los autores, una de las posibles razones por la que la leishmaniosis no estaría presente en la isla de Menorca podría ser la corta supervivencia detectada en las hembras de flebotomos (la mayoría de las hembras capturadas, incluso al final del periodo de actividad de los flebotomos, cuando la población envejece, eran hembras nulíparas), lo que dificultaría su papel vectorial.

Además de las formas clínicas aparentes, se ha puesto en evidencia la existencia de leishmaniosis críptica en las Baleares, primero en la isla de Ibiza (Riera y col., 2004). El análisis de 656 muestras de sangre procedentes del banco de sangre de las islas permitió detectar una seropositividad del 2,4% mediante una técnica de ELISA y del 7,6% mediante un Western Blot, siendo posible aislar el parásito en 3 ocasiones. El estudio comparativo de 122 de los donantes mostró prevalencias más elevadas cuando se utilizaban otras técnicas (nested-PCR e Intradermorreacción de Montenegro) (ELISA: 5,7%, WB: 11,5%, PCR: 22,1% y IDR: 22,3%). Un estudio posterior realizado en 1.437 donantes de las Islas Baleares (Mallorca, Formentera y Menorca) permitió detectar una seropositividad global del 3.1% mediante el Western Blot, siendo de un 4,1% en Mallorca, 1,5% en Formentera y 0,2% en Menorca (Riera y col., 2008).

I.3.3.- LA LEISHMANIOSIS CANINA DE LAS ISLAS BALEARES

El primer caso de leishmaniosis canina en las Islas Baleares data de 1989 (Matas-Mir y Rovira-Alos, 1989) en que se detecta una prevalencia del 14% en Mallorca. Con posterioridad, se han realizado varios estudios en las distintas islas (Tabla 4), observándose que la leishmaniosis canina autóctona está presente en Formentera, Ibiza y Mallorca, con unas prevalencias que oscilan entre el 6 y el 21,2%, y estaba ausente de Menorca hasta el trabajo efectuado en la presente Memoria.

Zona de estudio	Prevalencia	Cita bibliográfica
Mallorca	14%	Matas y Rovira, 1989
	45%	Pujol y col., 2007
Menorca	0%	Seguí, 1991a
Ibiza	9,8 - 21,2%	Nieto y col., 2003 (en http://www.scalibor)
	9,8	Chicharro y col., 2004
Mallorca e Ibiza	6,4%	Abellán García, 1997 (en http://www.scalibor)
Baleares datos generales	6%	PCPL, 1991 (en Alvar 2001)

Tabla 4. Prevalencia de la leishmaniosis canina en las islas Baleares (actualizada de Alvar., 2001 y <http://www.scalibor.es/leishmaniosis/prevalencia.asp>)

Con respecto a Menorca, Seguí (1991a, b, c) no se pudo demostrar la presencia de un foco autóctono de leishmaniosis canino en la isla tras la encuesta serológica realizada aprovechando la campaña de vacunación anti-rábica y la colaboración de varias consultas veterinarias privadas. Los pocos casos detectados positivos (8/813, 0,98%) eran en su totalidad de perros procedentes de otras áreas endémicas con focos bien establecidos: Barcelona (3 animales), Madrid (3), Palma (1) y Badajoz (1) por lo que se consideraron casos importados.

Los últimos datos de que se dispone de la leishmaniosis canina en las Islas Baleares son de Mallorca, de muestras obtenidas en 2005 de forma aleatoria (Pujol y col., 2007). El 45% de la población estudiada era seropositiva; sin embargo, debe mencionarse que si bien la muestra fue seleccionada, de forma aleatoria, por 70 veterinarios colaboradores, predominaba el veterinario de clínica sobre el rural (Figura 13)

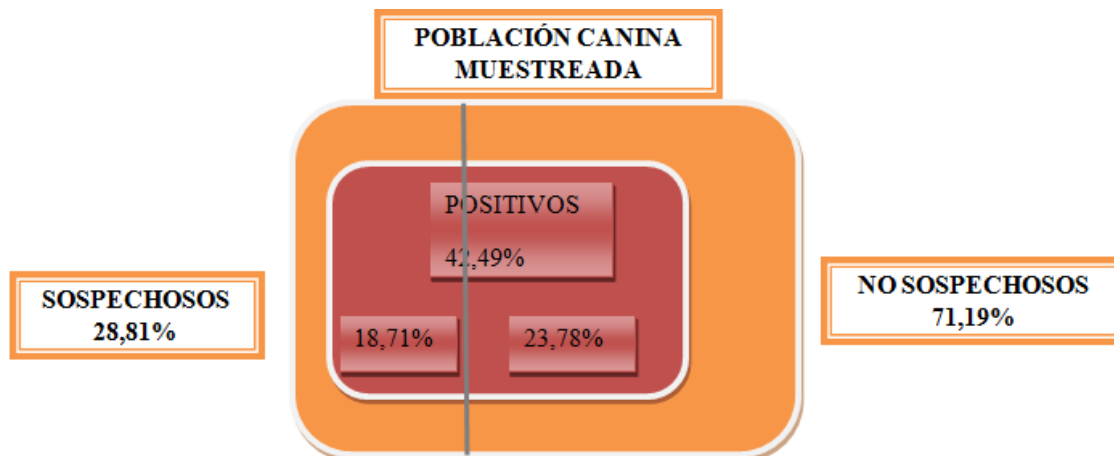


Figura 13. Leishmaniosis canina en Mallorca (tomado de Pujol y col., 2007).

Con respecto a la leishmaniosis en animales, ésta aparece reflejada en el listado de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) de otras enfermedades e infecciones, donde quedan recogidas las enfermedades transmisibles de importancia sanitaria y que son importantes en el comercio internacional de animales y productos de origen animal.(OIE 2011; 2014). En el estado español, la leishmaniosis se incluye en el *Real Decreto 526/2014* (Boletín Oficial del Estado n. 167) como enfermedad de declaración obligatoria y de la que se regula su notificación.

II.- HYPOTHESIS, OBJECTIVES AND WORK PLAN

Aprender tiene que ver con arriesgarse

Loise Stoll

II. HYPOTHESIS, OBJECTIVES AND WORK PLAN

II.1.- HYPOTHESIS

The distribution of leishmaniosis, both human and canine, is heterogeneous, with varying data of prevalence and incidence in different geographical areas and over time. There are various factors that can influence the transmission dynamics, including migration and climate change. These factors may promote the emergence and/or reemergence of the disease.

Regarding the island of Minorca, there are previous data about the absence of canine and human leishmaniosis. However, the presence of the vector, *Phlebotomus perniciosus*, along the island and the introduction of infected dogs from endemic areas led to consider the introduction of leishmaniosis

With respect to the island de Majorca, and at the contrary to Minorca, there are available data on the presence of an autochthonous focus of human and canine leishmaniosis, but the study of the sand fly fauna, in particular that of *P. perniciosus*, is very fragmented and incomplete. Since the focusing element on distribution of the leishmaniosis is the vector, studies on its distribution and the factors influencing this would provide data on the areas of risk for the disease.

However, the sole presence of a sand fly species, even if it is a potential vector according to the data of other areas, is not sufficient to incriminate it as a vector of the *Leishmania* species existing. This can be done only by showing the sand fly parasitism by *Leishmania*. While dissection would be the ideal method, demonstrating the multiplication of the leishmanias in the digestive tract of the vector, the low sensitivity of this technique has been led to implement molecular techniques for this purpose. Since not much data are available about the utility of these techniques, its use in sand flies captured "in situ" in different areas of leishmaniosis endemicity could provide useful information. If their utility could be demonstrated these techniques could be applied to epidemiological studies on leishmaniosis vectors in the Balearic Islands as well as in other endemic areas.

II.2.- OBJECTIVES

The overall objective of the study is to deepen the knowledge of the epidemiology of leishmaniosis in the Balearic Islands through the study of the islands of Minorca and Majorca, which shows a different degree of endemicity.

The specific objectives are:

1. To apply a nested-PCR technique to the study of the natural infection of the sand flies by *Leishmania infantum* and to obtain data on its usefulness in the incrimination of vectors and in the studies on the distribution and activity of leishmaniosis foci.
2. To observe the usefulness of the analysis of the sand fly blood-meal digestion in epidemiological surveys of leishmaniosis foci through the study in parallel of the degree of the blood meal digestion in the sand flies intestine and the sand fly parasitism by molecular methods.
3. To provide current data on the distribution and dynamics of canine leishmaniosis in the Balearic Islands.
4. To obtain current data about the presence and distribution of sand flies in the Balearic Islands (Majorca and Minorca) by implementing a standardized methodology.
5. To improve our understanding of the environmental factors influencing the distribution of the leishmaniosis potential vectors and to determine the risk factors influencing the presence of the disease.

II.3.- WORK PLAN

The following summarizes the plan of work undertaken to fulfill the objectives.

- 1) Application and utility of molecular techniques to the study of the parasitism by *Leishmania infantum* in sand flies and the study of the relationship existing between results and the degree of blood meal digestion in sand flies intestine.
 - Analysis of the sand fly blood-meal digestion in a stereomicroscope.

- Application of a nested-PCR for the detection of *Leishmania infantum* DNA to a representative sample of sand flies captured in three isolated farms of Catalonia. The farms were located in geographic areas with different degrees of canine and human leishmaniosis endemicity.
 - *Leishmania* molecular typing by ITS-1 n-PCR-RFLP of the sand fly samples positive to the nested-PCR.
- 2) Obtaining current data on the canine leishmaniosis in the Balearic Islands.
- Conference to the small animal's veterinarians practicing in the *Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears*, in order to let them know a veterinary questionnaire.
 - Retrospective survey on canine leishmaniosis carried out, through the questionnaire, among the veterinarians of the Balearic Islands and analysis of the results.
 - Cross-sectional study on canine leishmaniosis seroprevalence in the island of Minorca, using different serological tests, and analysis of the results.
- 3) Obtaining current data on the presence of sand flies in the Balearic Islands (Minorca and Majorca) as well as on the environmental and risk factors influencing the distribution of *P. perniciosus* and the presence of leishmaniosis.
- Capturing of sand flies with sticky traps during their period of activity in Majorca and Minorca (summer 2008 and 2009).
 - Collection, record of biotic and abiotic data of the sand fly sampling stations.
 - Study of the sandflies and analysis of the results.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

“No és tant el que fas com l’amor que poses en allò que fas”

Anònim

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se expone brevemente la zona de estudio y la metodología utilizada para la consecución de los objetivos planteados, por cuanto en los respectivos artículos incluidos en esta Memoria Doctoral ya se incluye datos relativos a los mismos.

III.1.- ZONA DE ESTUDIO

El estudio epidemiológico de la leishmaniosis, a través de la investigación de los vectores, se ha llevado a cabo principalmente en las Islas Baleares, concretamente en las islas de Mallorca y Menorca. Además, se ha incluido poblaciones de flebotomos de tres localidades catalanas (Torroja del Priorat, Sant Just Desvern y Ainet de Besan) para el estudio de la infección natural de los flebotomos.

El estudio del estado actual de la leishmaniosis canina se ha llevado a cabo en las Islas Baleares y, además, se incluye un estudio prospectivo de la misma en Menorca.

III.2.- ESTUDIO DE LOS FLEBOTOMOS

La captura de los flebotomos ha variado en función del tipo de estudio a realizar, utilizándose papeles adhesivos y trampas de luz. (Anexo1)

Para el estudio de la infestación natural de los flebotomos se ha utilizado la captura con trampas de luz que se colocaban próximas a animales, fundamentalmente perros. Se ha aplicado una nested-PCR siguiendo los protocolos descritos por Di Muccio y col. (2000), van Eys y col. (1992) y Velo y col. (2005). La identificación de la especie de *Leishmania* se llevó a cabo según Schönian y col. (2003) (Anexo 2)

El estudio del grado de digestión de la sangre ingerida por los flebotomos y del estado de gravidez de las hembras se llevó a cabo de acuerdo a Dolmatova y Demina, (1971) (anexo 3)

Para los estudios entomológicos acerca de la presencia, distribución y factores que afectan dicha presencia, de los flebotomos de Menorca y Mallorca, se realizaron capturas con papeles adhesivos, colocando las trampas durante cuatro noches consecutivas. En Menorca, las trampas fueron distribuidas a lo largo de transectos,

mientras que en Mallorca se procedió a colocar las trampas con objeto de cubrir las 77 cuadrículas de 5x5 Km en que se dividió la isla.

Los datos relativos a las estaciones se anotaron en una base de datos diseñada previamente con el programa Pendragon Form v.5.0 (proyecto Emerging Diseases in a changing European Environment, EDEN) (Ballart y col. 2014; Barón y col. 2011; Gálvez y col. 2010a, b) (anexo 4). Las coordenadas geográficas fueron recogidas mediante un Sistema de Posicionamiento Global (Global Positioning System: GPS) conectado a una agenda electrónica de bolsillo (personal digital assistant: PDA). Los datos climatológicos fueron facilitados por la delegación en las Baleares de la Agencia Meteorológica Española (AEMet). Mediante el programa ArcGis v.9.2. (ESRI, Redlands, CA, USA) se fueron asignando, a cada una de las estaciones, los datos meteorológicos (utilizando los datos correspondientes a la estación meteorológica más cercana mediante la herramienta espacial “join-and-relate” del ArcGis) (anexo 5), de uso de suelo (capa CORINE de 2,5m de resolución obtenida del Centro Nacional de Información Geográfica), los pisos bioclimáticos (capa obtenida de un enlace de la Universidad de Granada de los datos de Rivas Martínez, 1983) y de altitud (modelo digital de 90m de resolución, Jarvis y col., 2008). Con dicho programa se confeccionaron también los mapas de distribución de los flebotomos.

El procesamiento de los flebotomos se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona. Los flebotomos se recogieron con un pincel y se fijaron en alcohol de 70° hasta su observación en la lupa (hembras de *S. minuta* y machos) o el montaje en líquido de Hoyer y observación al microscopio (anexo 6). La identificación se llevó a cabo siguiendo las claves de Gállego y col. (1992) (anexos 7a y 7b).

III.3.- ESTUDIO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

El estudio sobre el estatus actual de la leishmaniosis canina se llevó a cabo mediante encuestas realizadas a los veterinarios de pequeños animales de las Islas Baleares con la Ayuda del *Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears* (COVIB) y según la ficha elaborada en el proyecto EDEN (anexo 8).

El estudio prospectivo de la leishmaniosis canina fue realizado en Menorca mediante análisis serológico del suero obtenido de animales de tres clínicas veterinarias. Los datos de cada perro se recogieron en fichas individuales elaboradas también según el proyecto EDEN (anexo 9). La serología se llevó a cabo, con ligeras modificaciones, según los protocolos de las técnicas “in house” de ELISA y Western Blot (Riera y col., 1999), IFI (Gradoni y Gramiccia, 2008) y la técnica comercial de ICF (Speed@Leish K, BVTGroup, Virbac) (Anexo 10).

III.4.- ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el estudio de la infección natural de los flebotomos por *Leishmania*, según la localidad de captura y la especie de flebotomo, se realizó una prueba exacta de Fisher. Para evaluar la asociación entre la positividad de la n-PCR y el grado de digestión de la sangre se utilizó un modelo de regresión logística. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico STATA v.10.

El efecto de 25 variables, relativas a la estación y climatológicas, en la densidad de *P. perniciosus* de Menorca se evaluó mediante modelos lineales generalizados basados en la distribución binomial negativa (Hilbe 2007) utilizando la función *glm.nb* del paquete estadístico MASS disponible en el software libre R (R Development Core Team, 2012). En primer lugar se realizó un análisis bivariante y en segundo lugar el multivariante utilizando las variables independientes que en el análisis bivariante mostraron un valor de $p \leq 0,2$. En el modelo multivariante se consideraron las variables independientes con $p \leq 0,05$. La comparación de los datos meteorológicos de la captura de dos años fue llevada a cabo utilizando un modelo lineal de regresión.

Para determinar los factores predictores de la presencia de *P. perniciosus* en la isla de Mallorca hemos realizado un análisis de regresión logística, usando como variable dependiente la presencia/ausencia de esta especie. Como variables independientes hemos utilizado un panel de 57 características ecológicas, epidemiológicas y medioambientales. En primer lugar se realizó un análisis bivariante. Posteriormente se procedió al análisis multivariante utilizando las variables independientes que en el análisis bivariante mostraron un valor de $p \leq 0,2$. En el modelo multivariante final se retuvieron únicamente las variables independientes con $p \leq 0,05$. Se utilizó el programa estadístico SPSS v.20.

IV.- RESULTADOS

“Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa”

Gandhi M

IV.- RESULTADOS

IV.1.- CAPÍTULO 1

Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis.

M. Magdalena Alcover, Marina Gramiccia, Trentina Di Muccio, Cristina Ballart, Soledad Castillejo, Albert Picado, Montserrat Portús, Montserrat Gállego.

Parasitology Research, 2012, 111(2): 515-523. doi: 10.1007/s00436-012-2863-4.

Los estudios epidemiológicos de la distribución de la leishmaniosis causada por *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) se han basado principalmente en estudios serológicos del reservorio canino. Esta metodología es útil debido a la facilidad de muestreo, la rapidez en la obtención de resultados, su consistencia y porque permite la detección de focos heterogéneos de la leishmaniosis canina incluso en áreas pequeñas. Otras investigaciones han analizado el parasitismo en los flebotomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) mediante el uso de técnicas de disección clásica. Éstas permiten la incriminación de las especies de vectores en diferentes focos, aunque presentan el inconveniente de requerir mucho tiempo. Últimamente, los estudios en este campo están empleando cada vez más las técnicas moleculares, más rápidas y más fáciles de realizar. En este trabajo, se aplicó una PCR-anidada al estudio de la infección natural por *Leishmania* de los flebotomos capturados en tres granjas aisladas, de donde también se obtuvieron datos serológicos sobre la leishmaniosis canina de los perros locales. El análisis permitió detectar una PCR-anidada positiva en el 38,7% de las hembras (78%, 18% y 0%, respectivamente, en las diferentes granjas). Las muestras de ADN de *Leishmania* positivas fueron genotipadas e identificadas como *L. infantum*. Los resultados de este trabajo aportan nuevos datos sobre la capacidad vectorial de *Phlebotomus ariasi* en una zona de los Pirineos considerada como posible nuevo foco de leishmaniosis canina. Las hembras con PCR-anidada positiva presentaron sangre en el intestino medio en diferentes grados de

digestión y/o estaban grávidas. Según el análisis de regresión logística multivariante, el riesgo de positividad en la PCR-anidada aumentó significativamente con el grado de digestión sanguínea (OR = 1,3; p = 0,025). La especie de *Phlebotomus* y la presencia de huevos en las hembras analizadas no presentaron un grado de asociación estadísticamente significativa (p > 0,05) con la positividad de la PCR-anidada. La correlación de los resultados positivos de la PCR-anidada con la presencia de perros seropositivos en la granja confirma la utilidad de esta técnica en el estudio de la distribución y la intensidad de los focos de leishmaniosis. Además, se ha mostrado la importancia que presenta, en los estudios epidemiológicos de los focos de leishmaniosis, observar el tipo de ingestión y digestión de la sangre de los flebotomos.

Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis

M. Magdalena Alcover · Marina Gramiccia ·
Trentina Di Muccio · Cristina Ballart ·
Soledad Castillejo · Albert Picado · Montserrat Portús ·
Montserrat Gállego

Received: 28 November 2011 / Accepted: 10 February 2012 / Published online: 2 March 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Epidemiological studies on the distribution of leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) have been based principally on serological surveys of the canine reservoir. This methodology is useful due to the facility of sampling, the rapidity in obtaining results, its consistency and because it allows the detection of heterogeneous foci of canine leishmaniasis (CanL) even in small areas. Other investigations have analysed *Leishmania* parasitism in sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by using classical dissection techniques. These techniques allow the vector species to be incriminated in different foci, although they suffer from being very time consuming. Lately, studies in

this field are increasingly using molecular techniques, which are faster and easier to perform. In the present work, we applied a nested-PCR in a study of natural infection of sandflies by *Leishmania* in three isolated farms where serological data on canine leishmaniasis of local dogs were also obtained. The analysis allowed the detection of 38.7% of females with positive nested-PCR (78%, 18% and 0%, respectively, in the different isolated farms). The positive *Leishmania* DNA samples were genotyped and identified as *L. infantum*. The results of this work provide new data for the vectorial capacity of *Phlebotomus ariasi* in a Pyrenean area, which can be considered at risk of becoming a new focus of CanL. The females with positive nested-PCR displayed blood in the midgut at different degrees of digestion, and/or were gravid. According to the multivariate logistic regression analysis, the risk of nested-PCR-positivity increased significantly with the degree of blood digestion (OR=1.3; *P* value=0.025). The *Phlebotomus* species and the presence of eggs were not statistically associated with nested-PCR positivity (*P* value of >0.05). The correlation of positive nested-PCR results with the presence of seropositive dogs in the farm confirms the utility of this technique in the study of the distribution and intensity of leishmaniasis foci. Also, the importance of sandfly blood-meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis foci has been demonstrated.

M. M. Alcover · C. Ballart · S. Castillejo · M. Portús ·
M. Gállego (✉)
Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia,
Universitat de Barcelona,
Av. Joan XXIII s/n,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: mgallego@ub.edu

M. M. Alcover · C. Ballart · S. Castillejo · M. Gállego
Barcelona Centre for International Health Research
(CRESIB, Hospital Clinic-Universitat de Barcelona),
Barcelona, Spain

M. Gramiccia · T. Di Muccio
Section of Vector-Borne Diseases and International Health,
MIPI Department, Istituto Superiore di Sanità,
Rome, Italy

A. Picado
Department of Public Health, Institute of Tropical Medicine,
Antwerp, Belgium

Introduction

The leishmaniasis are transmissible vector-borne diseases that affect humans and other reservoir hosts, mainly dogs in

Mediterranean areas, and are transmitted by the bite of infected female sandflies (Gállego 2004). The leishmania life cycle in the vector and vector competence have been reviewed by several authors (Sacks 2001; de Almeida et al. 2003; Volf et al. 2008). The amastigotes in the vertebrate hosts are ingested when the female sandfly takes an infected bloodmeal. After morphological and functional modifications in the insect's midgut, an infection is established at the stomodeal valve at the metacyclic promastigotes stage, which in some cases is accompanied by an invasion of the mouthparts. When the infected phlebotomine bites a new host, it regurgitates about 1 to 1,000 metacyclic promastigotes, closing the life cycle. Transmission may also occur by the transfer of parasites from heavily infected mouthparts into the skin during biting or by invasion of the salivary glands and deposition of metacyclic promastigotes into the skin with the saliva (Killick-Kendrick and Rioux 2002). The exact time from an infected bloodmeal until a female can transmit leishmaniasis is not known and varies according to the gonotrophic cycle and the ambient temperature. Other factors could be influential, such as the sugars taken by the females (WHO 2010).

Approximately 800 species of sandflies have been described, 95 of which are proven or suspected vectors of more than 20 *Leishmania* species (Killick-Kendrick 1999; WHO 2010). Vector efficiency depends on several factors, including biting habits and ability to survive and the parasite's ability to multiply and survive during the bloodmeal digestion.

Epidemiological studies regarding the endemicity of leishmaniasis foci have been carried out principally by serological surveys of human (HL) and canine leishmaniasis (CanL) (Fisa et al. 1999; Iniesta et al. 2002; Riera et al. 2004). The classical method of vector incrimination involves the dissection of sandflies and culture of parasites found in the intestine (Rioux et al. 1986; Martín-Sánchez et al. 2006; Rossi et al. 2008). This method allows *Leishmania* strains to be isolated from sandflies but needs fresh or cryopreserved specimens, dissecting expertise, is time consuming and lacks sensitivity (Kato et al. 2005). Since the 1990s, several molecular techniques have been developed and applied in this specific field (Perez et al. 1994; Aransay et al. 2000; Kato et al. 2005; Velo et al. 2005; Martín-Sánchez et al. 2006; Pandey et al. 2008; Rossi et al. 2008). The advantages of PCR techniques include greater sensitivity, specificity, versatility and rapid processing of a large number of phlebotomine sandfly samples, as described by the above authors. For these reasons, molecular techniques have also been applied in the study of arthropods other than sandflies as potential vectors of *Leishmania infantum* (Dantas-Torres et al. 2010; Colombo et al. 2011).

In the present work, we applied a nested-PCR (n-PCR) method in the study of natural infection of sandflies by *L.*

infantum Nicolle, 1908 at three isolated farms in three localities of Catalonia. Positive DNA specimens were identified by *Leishmania* sp. Internal-transcribed spacer-1 (ITS-1) molecular typing to confirm the role of sandfly species as *Leishmania* vectors. Serological data on canine leishmaniasis were also obtained for the dogs living in the farms at the time of sandfly capture. The degree of blood meal digestion was also evaluated to identify the vectorial capacity of the sandflies.

Materials and methods

Study area

The study was carried out in three isolated farms from three localities of Catalonia (North East Spain): Torroja del Priorat, Sant Just Desvern and Ainet de Besan, each one in a different county ("comarca") and province of Catalonia (Fig. 1). The characteristics of the sampling stations and the periods of sandfly captures are included in Table 1.

Torroja del Priorat is located in a known endemic focus of HL and CanL, with an overall CanL seroprevalence of 20% (Fisa et al. 1999), which is highest in suburban and rural areas (33%) (Castillejo 2008). No data concerning CanL seroprevalence are available for the other two villages. Official data on the annual incidence of HL in each county are included in Table 1 (Portús et al. 2007).

Serological analysis of the farm dogs

Samples of peripheral blood were obtained by cephalic vein puncture with the agreement of the dog owners at the time of sandfly capture. The dogs were analysed by an in-house ELISA assay performed as described elsewhere with some modifications (Riera et al. 1999). Sonicated promastigotes of an autochthonous *L. infantum* strain (MCAN/ES/92/BCN-83) belonging to zymodeme MON-1 were used at a protein concentration of 20 µg/ml in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6. The sera were diluted to 1:400 in phosphate-buffered saline-Tween 1% milk (Sigma, St. Louis, MO, USA) and protein A peroxidase (1:30,000; Sigma) was used as the second antibody. The reaction was quantified in units (U) by reference to a positive serum arbitrarily set at 100 U. The cut-off was established at 24 U.

Sandfly collection, blood digestion, and morphological identification

Captures were made with CDC-like traps constructed at the *Serveis Científico-tècnics* at the *Universitat de Barcelona*. The traps were set at sunset during the sandfly transmission

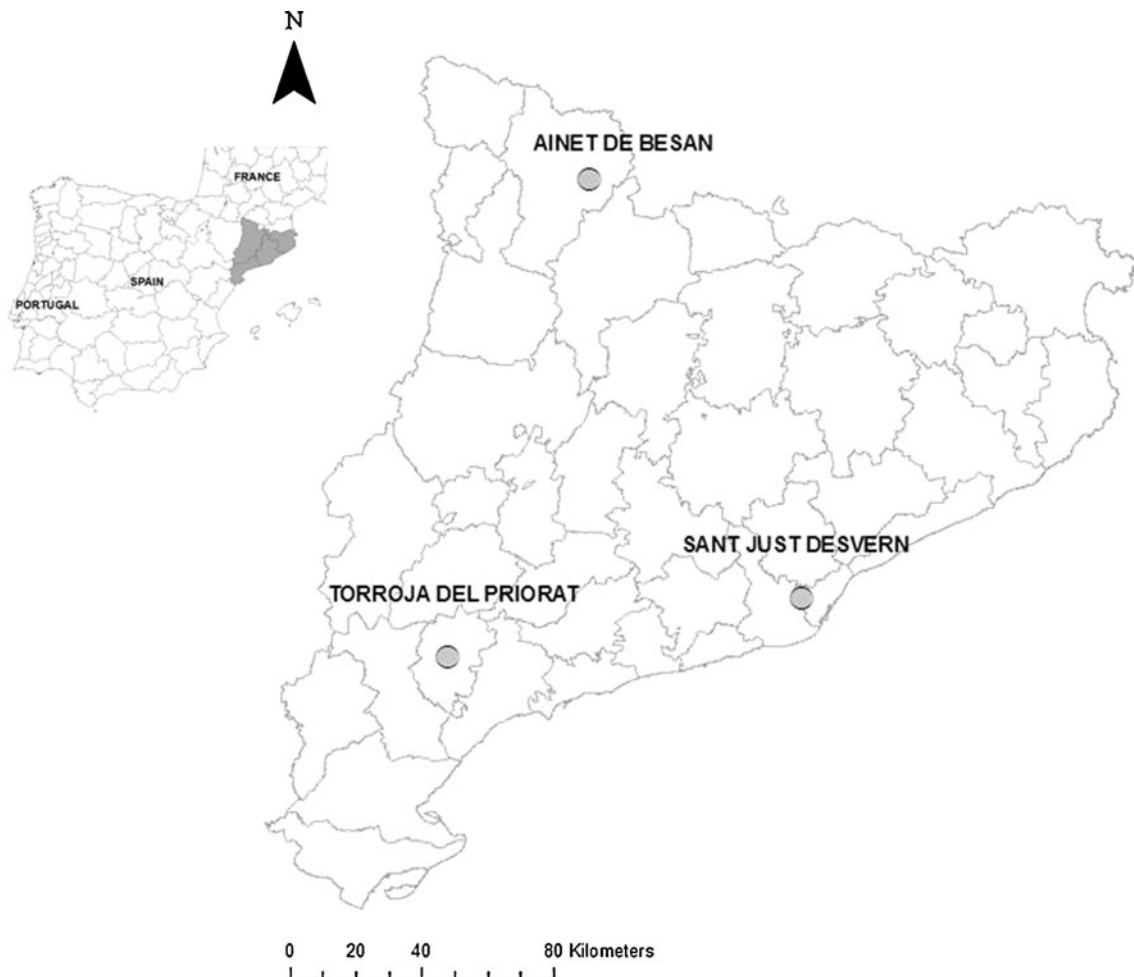


Fig. 1 Sampling sites of sandflies in Catalonia (NE Spain)

season and left in operation all night (from 8 p.m. to 8 a.m.) in the proximity of the dogs and other animals present in the farms (Table 1). Sandflies were removed from the traps with an electrical aspirator and then placed in a freezer to reduce their activity. Finally, about 30–50 specimens were put in single cryotubes and conserved in liquid nitrogen until their analysis.

One cryovial was randomly chosen from each farm among those conserved in liquid nitrogen. Females were transferred to a glass slide and dissected by removing the terminal segment of the abdomen in order to carry out their identification. The dissected females were examined under a microscope in order to identify the degree of blood digestion, following a previously established protocol (Dolmatova and Demina 1971) that allows the identification of seven categories of digestion. Sandflies were identified on the basis of their morphological features following the keys of Gállego et al. (1992). Accordingly, genitalia were clarified with chloroacetophenol, mounted in Canada balsam, and identified under an optical microscope.

Leishmania infection in sandflies: ssu rDNA n-PCR

The presence of *Leishmania* DNA was assayed individually in randomly selected females. Genomic DNA was extracted from each specimen identified as *Phlebotomus* spp. with phenol–chloroform, precipitated with 100% ethanol, and then centrifuged for 30 min at 13,000 rpm. The DNA pellet was resuspended in 50 μ l of sterile water and stored at -20°C until the n-PCR assay (Di Muccio et al. 2000).

In the n-PCR assay, the first amplification was carried out in a 50 μ l volume of 10 μ l DNA plus 40 μ l PCR Master Mix (Promega) containing 50 pmol of the kinetoplastid-specific primers R221 and R332 of the small subunit rRNA gene (ssu rDNA) (van Eys et al. 1992). For the second amplification, 3 μ l of the first PCR product was added to 47 μ l of PCR Master Mix (Promega) containing 50 pmol of the *Leishmania*-specific primers R223 and R333 of the same gene (van Eys et al. 1992). The cycling conditions were denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s (65°C for 30 s for the second PCR) and extension at 72°C

Table 1 Characteristics of sandfly capture sites and data on the incidence of HL in counties of Catalonia

County (province)	Nearest locality (distance)	Year of capture	Site relative to settlement	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Adjacent flora	Presence of dogs (number)	Presence of other animals	Incidence of HL in the counties (Portús et al. 2007)
Priorat (Tarragona)	Torroja del Priorat (0.8 km)	July 2003	Between localities	41°13' 10.89" N	0°48' 12.76" E	289	Mixed oak	5	Rabbits	>5 cases/100,000 inhabitants
Pallars Sobirà (Lleida)	Ainet de Besan (1.37 km)	July 2007	Between localities	42°32' 11.77" N	1°16' 51.23" E	953	Mixed oak	3	Cows and rabbits	0.5–0.9 cases/100,000 inhabitants
Baix Llobregat (Barcelona)	Sant Just Desvern (0.82 km)	July 2002	Between localities	41°24' 0.01" N	2°5'5.05" E	177	Holm oak	3	Sheep and goats	0.25–0.49 cases/100,000 inhabitants

for 30 s (Velo et al. 2005). Two negative controls (no DNA and DNA from male *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 or *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 samples) and one positive control (a mixture of DNAs from *L. infantum* cultured promastigotes and colonized *P. perniciosus* samples) were used. A sample of 20 µl of the amplification products was analysed on 1.5% agarose gel and visualized under UV light. Positive samples yielded a predicted n-PCR product of 358 bp. This technique can detect virtually 5×10^{-4} parasite DNA.

Contamination by amplicons was avoided, as previously described, by using physical separation (rooms and materials) as well as decontamination procedures (UV exposure and bleaching of materials and surfaces). Cross contamination was monitored with negative controls for sample extraction and PCR solutions.

Leishmania sp. molecular typing: n-PCR—restriction fragment length polymorphism analysis

DNAs from sandfly specimens positive to ssu rDNA n-PCR were genotyped by ribosomal internal-transcribed spacer-1 (ITS-1) n-PCR, followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis (ITS-1 n-PCR-RFLP) for *Leishmania* species molecular identification. Primers LITSR and L5.8 S were used to amplify a specific ITS-1 region in the ribosomal operon. Nested ITS-1 PCR was performed on 2 µl of the previous ITS-1 PCR products using the same primer combination and PCR conditions as for the first round of amplification (Schönian et al. 2003). Negative (no DNA, DNA from colonized *P. perniciosus*) and two different positive *Leishmania* spp. (*L. infantum*, MHOM/TN/80/IPT1; *Leishmania tropica* MHOM/SU/74/K27) DNA controls were used in amplifications. Molecular genotyping of *Leishmania* species was achieved by RFLP analysis of the 300–350 bp amplified sequence. Ten microliters of the PCR product were added to 2 µl of the enzyme buffer and 0.5 µl (10 U) of the restriction enzyme *HaeIII*; this mixture was incubated at 37°C for 3 h, as recommended by the manufacturer (Promega). All PCR-RFLP products were analyzed by 4% MetaPhor agarose gel.

Statistical analyses

The number of n-PCR-positive samples of female sandflies was tabulated per location and species. The proportion of n-PCR-positive vectors (*P. ariasi* and *P. perniciosus*) per location was compared using Fisher's exact test.

To evaluate the association between n-PCR-positivity and the degree of blood digestion, only the blood-fed females of *P. ariasi* and *P. perniciosus* of farms from Torroja del Priorat and Ainet de Besan were used. A logistic regression model was used to assess the association between PCR-

positivity and the degree of blood digestion. The origin of the sandflies, the *Phlebotomus* species and the presence of eggs (i.e., yes or no) were included in the model as covariates but were removed from the final model if not statistically significant (P value of <0.05). The predicted values of the logistic regression model (i.e., probability of obtaining a n-PCR-positive in function of the degree of blood digestion) were plotted.

Results

Canine leishmaniasis in the farms

A total of 11 dogs were examined from the three farms: five from Torroja del Priorat, three from Ainet de Besan, and three from Sant Just Desvern. Six of the examined dogs were serologically positive: the five dogs from the rabbit farm of Torroja del Priorat and one of the three dogs from the farm in Ainet de Besan. None of the three dogs from the Sant Just Desvern farm was serologically positive (Table 1).

Leishmania positivity infection in sandflies by n-PCR

Only females of the genus *Phlebotomus* were included in the analysis (70 *P. ariasi*, 31 *P. perniciosus*, and 10 *Phlebotomus sergenti*) and the three captured males, one of *P. ariasi* (Ainet de Besan), and two of *P. perniciosus* (Torroja del Priorat and Sant Just Desvern) were used as negative controls. The proportions of n-PCR-positive samples in the different farms were 76.6% in Torroja del Priorat, 18.9% in Ainet de Besan, and 0% in Sant Just Desvern (Table 2). The differences were statistically significant (P value of <0.001). In addition, the single specimen of *P. sergenti* collected in Torroja del Priorat was n-PCR positive (Table 2).

A total of 68 blood-fed female sandfly vectors of *L. infantum* (56 *P. ariasi* and 12 *P. perniciosus*) captured in Torroja del Priorat and Ainet de Besan were included in the statistical model to study the association between blood digestion and n-PCR results. According to the multivariate logistic regression model, the risk of n-PCR positivity increased significantly with the degree of blood digestion (OR=1.3; P value=0.025). The level of risk differed between the two farms (OR=0.1, P value of <0.001), which was clearly visualized when the probability of n-PCR positive results per degree of digestion was plotted (Fig. 2). The sandfly species and the presence of eggs in female sandflies were not statistically associated with n-PCR positivity (P value of >0.05) and were not kept in the final model.

Leishmania sp. molecular typing

Leishmania molecular typing by ITS-1 n-PCR-RFLP analysis was carried out on the 43 sandfly specimens that were *Leishmania* ssu rDNA n-PCR positive: 30 *P. ariasi* (23 from Torroja del Priorat and 7 from Ainet de Besan), 12 *P. perniciosus* (from Torroja del Priorat) and 1 *P. sergenti* (from Torroja del Priorat). Twenty-six *P. ariasi* (20 from Torroja del Priorat and 6 from Ainet de Besan), nine *P. perniciosus* from Torroja del Priorat, and one *P. sergenti* from Torroja del Priorat were positive to ITS-1 n-PCR-RFLP showing the specific *L. infantum* pattern (184–72–55 bp bands) (Fig. 3).

Discussion

The estimation of transmission intensity in a leishmaniasis focus is based on different indicators. In Spain, as in other countries worldwide, these studies have included serological

Table 2 Distribution of sandfly species and results of n-PCR-positive samples per location

Location	Species	Number of specimens	n-PCR positive (number; percentage \pm 95% confidence interval)
Torroja del Priorat	<i>Phlebotomus ariasi</i>	32	23 (71.9 \pm 6.3)
	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	14	12 (85.7 \pm 5.7)
	<i>Phlebotomus sergenti</i>	1	1 (100)
	Total	47	36 (76.6 \pm 12.1)
Ainet de Besan	<i>P. ariasi</i>	36	7 (19.4 \pm 12.9)
	<i>P. perniciosus</i>	1	0 (0)
	Total	37	7 (18.9 \pm 12.05)
Sant Just Desvern	<i>P. ariasi</i>	2	0 (0)
	<i>P. perniciosus</i>	16	0 (0)
	<i>P. sergenti</i>	9	0 (0)
	Total	27	0 (0)

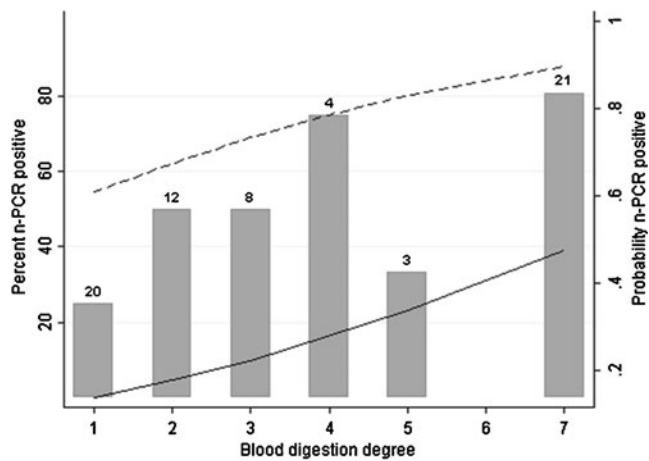


Fig. 2 Histogram representing the percentage of n-PCR-positive sandflies (*P. ariasi* and *P. perniciosus*) degree of blood digestion. The total number of sandflies per degree of digestion is also presented on the top of each bar. The logistic regression predictive values representing the probability of a n-PCR-positive sample in function of the degree of blood digestion in Torroja del Priorat (dashed line, sandflies analyzed—*P. ariasi*, 26 and *P. perniciosus*, 11) and Ainet de Besan (solid line, sandflies analyzed—*P. ariasi*, 30 and *P. perniciosus*, 1) are also plotted

surveys mainly of the canine reservoir but also of the human population (Riera et al. 2004; Portús et al. 2007). Serological surveys are useful due to the facility of sampling, rapidity in obtaining results, consistency and because they allow the detection of a heterogeneous distribution of CanL even in small foci. Nevertheless, some inconveniences have been reported, including the limited sensitivity of the serological techniques or the detection of false-positive results (Alvar et al. 2004). Other invasive techniques, like Montenegro's intradermal reaction test, have been used in humans and more recently in dogs (Iniesta et al. 2002, Riera et al. 2004), but false-positive results can occur due to the phenol-containing diluent (Pineda et al. 2001). Other investigations in leishmaniasis endemicity have analysed *Leishmania*

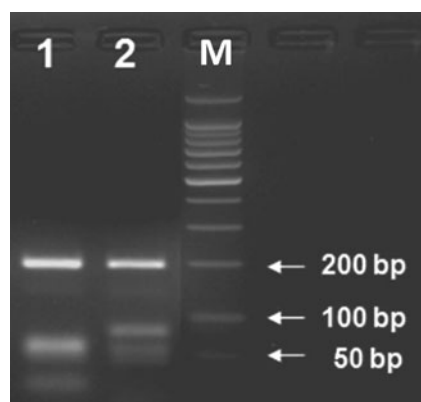


Fig. 3 RFLP analysis (ITS-1 region). Line 1, *L. tropica* (185, 57, 53, and 24 bp), line 2, *L. infantum* (184, 72, and 55 bp), and M, 50-bp DNA ladder marker

parasitism in sandflies by classical dissection methods. Although these are time-consuming and need a large number of specimens (Rossi et al. 2008), they allow vector species to be incriminated in different foci, as has been done with *P. ariasi* and *P. perniciosus* in Spain (Rioux et al. 1986). The increasing application of molecular techniques in this field has considerably reduced the time involved in obtaining results, although their scarce use in Spain has resulted in only one publication to date (Martín-Sánchez et al. 2006).

In the present work, we applied a n-PCR technique in the study of three sandfly populations captured in isolated farms located in different counties of Catalonia, each with a different degree of HL and CanL prevalence. The overall n-PCR positivity in sandflies was high (38.7%) and the results obtained from the three sandfly populations were related with the number of infected dogs found in each farm as well as the level of HL endemicity in the respective counties (Portús et al. 2007) (Tables 1 and 2). Torroja del Priorat is a well-known endemic focus of CanL (Fisa et al. 1999) and HL, but none of the dogs studied in this location showed clinical signs of the disease, despite the high percentage of sandflies detected with leishmanial DNA (76.6%). This supports the postulation that asymptotically infected dogs may play an important role in the transmission of the disease (Molina et al. 1994). In the other two locations, despite the low number of dogs studied, the n-PCR results correlated with the serological results. In Sant Just Desvern the negative serological and n-PCR results obtained in the dogs and sandflies could be explained by the limited size of the sampling area and the low dispersal capacity of sandflies since the HL data for the county and the opinion of local veterinarian practitioners confirm the presence of CanL in this location. The results demonstrate the utility of this technique for the study of the distribution and intensity of leishmaniasis foci.

The detection of *Leishmania* DNA was similar in the *P. ariasi* and *P. perniciosus* specimens captured in the farm of Torroja del Priorat. These results match those previously obtained in this locality by classical dissection, confirming that both species act as *L. infantum* vectors in sympatric conditions (Rioux et al. 1986). Nevertheless, it is difficult to compare the proportion of infected sandflies detected in the two studies because of the different times of sandfly capture, locations and size of sampling sites. In the farm of Ainet de Besan only *P. ariasi* was n-PCR-positive (the single specimen of *P. perniciosus* captured did not allow vectorial comparison).

Susceptibility and resistance of sandflies to the complete development of *Leishmania* appears to be under genetic control. It has been shown experimentally that differences exist in the ability of the parasite to survive within the early blood-fed midgut and/or to persist in the gut after excretion of the digested bloodmeal (Sacks 2001). The mere detection

of *Leishmania* DNA in a sandfly specimen does not prove that it is acting as a competent vector (Rossi et al. 2008). Thus, the finding of *L. infantum* DNA in one specimen of *P. sergenti* does not implicate this sandfly as a vector of this *Leishmania* species in the area. *P. sergenti* is a vector of *L. tropica*, which causes cutaneous leishmaniasis in humans, and can also feed on and transmit *L. tropica* to dogs (Dereure et al. 1991). Nevertheless, despite the presence of *P. sergenti* populations in Spain, genetically identical to those found in a new focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco (Barón et al. 2008), until now *L. tropica* has not been identified in the country.

Opportunistic behaviour of sandflies regarding feeding tropism has been observed for some species (Guy et al. 1984; de Colmenares et al. 1995). As mentioned, *P. sergenti* can bite dogs and it has been demonstrated in experimental conditions that this species can initially become infected with *L. infantum* to a similar extent as *P. perniciosus*, although after 3–4 days the parasites are lost (Killick-Kendrick 1985), reducing or voiding their transmission capacity. Due to their great sensitivity, PCR techniques are able to detect parasites in infected sandflies irrespective of their quantity, stage, location in the gut or proboscis and transmissibility (Perez et al. 1994). *Leishmania*-DNA-positive sandflies can include not only those carrying live promastigotes, but also those carrying DNA fragments of *Leishmania* resulting from non-established infections or blood meals containing *Leishmania* fragments (Gradoni 2002).

Leishmania DNA has also been found in ticks and fleas parasitizing dogs, including in experimental conditions, but these findings do not conclusively demonstrate that these arthropods can act as leishmaniasis vectors (Dantas-Torres et al. 2010; Paz et al. 2010; Colombo et al. 2011).

Despite these inconveniences, detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sandflies is important for predicting the risk and expansion of leishmaniasis in endemic areas. In our study, n-PCR has been useful in detecting differences between farms in areas with varying levels of CanL and HL incidence. Furthermore, the specificity of PCR techniques avoids the common mistake of considering motile flagellates (not only *Leishmania* spp.) in sandfly guts as necessarily an indication of *Leishmania* infection (Perez et al. 1994).

Most female sandflies require a bloodmeal for egg development, which allows contact with both infected and non-infected hosts and the transmission of leishmaniasis. *P. ariasi* and *P. perniciosus* are gonotrophically concordant and do not feed again until the bloodmeal is digested and the eggs are laid (Killick-Kendrick and Rioux 2002; WHO 2010). When the parasites arrive in a susceptible sandfly gut, to be infective they should multiply at the same time as the blood

is digested, and the promastigotes should remain in the gut at the moment of defecation before finally reaching the stomodeal valve and mouth parts. Presumably, an increasing degree of blood digestion would result in the presence of more parasites and thus a higher possibility of detecting leishmania DNA. The intensity of infection by *L. infantum* in *P. ariasi* in natural conditions increases progressively during the second and third ovarian cycles (Killick-Kendrick and Rioux 2002).

A literature search (PubMed and ISI Web of Knowledge) did not yield any studies on the correlation between positivity in dissecting and/or molecular methods and the degree of blood digestion in sandflies in natural conditions. When different techniques (classical dissection and estimation in situ, direct counting with a hemocytometer and quantitative PCR) for calculating the degree of infestation were compared in experimental conditions, the results differed depending on whether the sandflies were examined before or after defecation. The greater sensitivity of PCR has also been demonstrated (Myskova et al. 2008).

The results obtained in the present study show a higher percentage of n-PCR positivity with increased blood digestion. In previous studies, it has been difficult to calculate the degree of infestation by non-molecular techniques when a semidigested bloodmeal contains erythrocytes or when promastigotes remain attached to the midgut tissue (Myskova et al. 2008).

In sandflies with a low degree of digestion, there is a strong possibility that the detected DNA belongs to the recently ingested amastigotes or to initially formed non-infective promastigotes. As the bloodmeal digestion increases, so does the multiplication of the promastigotes and the probability in finding metacyclic forms.

No sandfly without a blood meal gave positive n-PCR results, possibly due to the loss of parasites during defecation (Myskova et al. 2008). The possibility that most females were nulliparous must also be taken into account, even though the captures were performed during July when several gonotrophic cycles had probably taken place.

The only specimen of *P. sergenti* found positive for *L. infantum* DNA showed blood digestion level 2, but, as mentioned before, it is likely that this specimen would lose the parasites after ingestion (Killick-Kendrick 1985). The vectorial role of this species for *L. tropica* has also been commented on.

The results of this work confirm the vectorial capacity of *P. ariasi* and *P. perniciosus* in the transmission of *L. infantum* in the locality of Torroja del Priorat and also provide new data for *P. ariasi* in Ainet de Besan, which can be considered at risk of becoming a new focus of CanL (Ballart et al. 2012). The utility of molecular techniques and importance of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis foci have been demonstrated.

Acknowledgments Work supported by projects FIS01/0831 (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain), AGL2004-06909-CO2-01/GAN (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain), 2009SGR385 (Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain), and 40076/GOCE-CT-2003-010 (6th Framework Programme, EU, Emerging Diseases in a changing European eNvironment) and catalogued by the EDEN Steering Committee as EDEN0267 (www.edenfp6project.net). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. Thanks are due to M. Maroli and G. Bongiorno for helping in blood digestion identification and to the ISS that accept M.M. Alcover for a stage in the Section of Vector-Borne Diseases and International Health. We thank the farm owners that allowed us to collect blood samples from the dogs and to capture the sandflies.

Ethical standards The experiments of the manuscripts submitted for publication comply with the current laws of Spain and Italy.

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

References

- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004) Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57:1–88. doi:10.1016/S0065-308X(04)57001-X
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y (2000) Detection and identification of leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol* 66:1933–1938. doi:0099-2240/00/\$04.0010
- Ballart C, Alcover MM, Portús M, Gállego M (2012) Is leishmaniasis widespread in Spain? First data on canine leishmaniasis in the province of Lleida, Catalonia, northeast Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 106:134–136. doi:10.1016/j.trstmh.2011.11.001
- Barón S, Martín-Sánchez J, Gállego M, Morales-Yuste M, Boussaa S, Morillas-Márquez F (2008) Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Trop* 107:259–267. doi:10.1016/j.actatropica.2008.07.003
- Castillejo S (2008) Factores que influyen en la incidencia de la leishmaniasis a través de un estudio epidemiológico longitudinal en el foco de la comarca del Priorato. Ph.D. dissertation, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
- Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chioccia VL (2011) Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res* 109:267–274. doi:10.1007/s00436-010-2247-6
- Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandão-Filho SP, Alves LC, Otranto D (2010) Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res* 106:857–860. doi:10.1007/s00436-010-1722-4
- de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M (2003) Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:861–870
- de Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Wolff M, Seguí G (1995) Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J Med Entomol* 3:229–233
- Dereure J, Rioux JA, Gállego M, Périères J, Pratlong F, Mahjour J, Saddiki A (1991) *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85:595
- Di Muccio T, Marinucci M, Frusteri L, Maroli M, Pesson B, Gramiccia M (2000) Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larrousius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect Biochem Mol Biol* 30:387–393. doi:10.1016/S0965-1748(00)00012-6
- Dolmatova AV, Demina NA (1971) Les Phlébotomes (Phlebotominae) et les Maladies qu'ils transmettent. Editions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (O.R.S.T.O.M.) Initiations-Documentations Techniques, 18, pp 167. Available from: [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/Idt/05283.pdf#search="phlebotomes_dolmatova"](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/Idt/05283.pdf#search=)
- Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M (1999) Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83:87–97. doi:10.1016/S0304-4017(99)00074-6
- Gállego M (2004) Emerging parasitic zoonoses: leishmaniasis. *Rev Sci Tech* 2:661–676
- Gállego J, Botet J, Gállego M, Portús M (1992) Los flebotomos de la España Peninsular e islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. In: "In memoriam" al Profesor Doctor D. F. de P. Martínez Gómez. S. Hernández Rodríguez. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, pp 581–600
- Gradoni L (2002) The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: moving towards a solution. In: Proceedings of the Second International Canine leishmaniasis forum, Sevilla, Spain, pp 7–14
- Guy MW, Killick-Kendrick R, Gill GS, Rioux JA, Bray RS (1984) Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses. *Ann Parasitol Hum Comp* 59:449–458
- Iniesta L, Fernández-Barredo S, Bulle B, Gómez MT, Piarroux R, Gállego M, Alunda JM, Portús M (2002) Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:1137–1141. doi:10.1128/CDLI.9.5.1137-1141.2002
- Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashiguchi Y (2005) Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 72:87–93
- Killick-Kendrick R (1985) Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exot* 78:747–755
- Killick-Kendrick R (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 17:279–289. doi:10.1016/S0738-081X(99)00046-2
- Killick-Kendrick R, Rioux JA (2002) Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia* 44:67–71
- Martín-Sánchez J, Gállego M, Barón S, Castillejo S, Morillas-Márquez F (2006) Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:527–532. doi:10.1016/j.trstmh.2005.08.005
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J (1994) Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:491–493
- Myskova J, Votypka J, Volf P (2008) *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *J Med Entomol*

- 45:133–138. doi:10.1603/0022-2585(2008)45[133:LISFCO]2.0.CO;2
- Pandey K, Pant S, Kanbara H, Shuaibu MN, Mallik AK, Pandey BD, Kaneko O, Yanagi T (2008) Molecular detection of *Leishmania* parasites from whole bodies of sandflies collected in Nepal. *Parasitol Res* 103:293–297. doi:10.1007/s00436-008-0967-7
- Paz GF, Ribeiro MF, Michalsky EM, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Barata RA, Fortes-Dias CL, 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. doi:10.1007/s00436-009-1697-1
- Perez JE, Ogusku E, Ingá R, Lopez M, Monje J, Paz L, Nieto E, Arevalo J, Guerra H (1994) Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88:161–164
- Pineda JA, Macías J, Morillas F, Fernández-Ochoa J, Cara J, de la Rosa R, Martín-Sánchez J, González M, García-Briones E, Delgado J, Lissen E (2001) False-positive results of leishmanin skin test due to phenol-containing diluent. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95:173–174
- Portús M, Gállego M, Riera C, Fisa R, Aisa MJ, Botet J, Carrió J, Castillejo S, Iniesta L, López P, Montoya L, Muñoz C, Serra T, Gállego J (2007) A review of human and canine leishmaniasis in Catalonia, and associated vector distribution. *Rev Ibér Parasitol* 67:59–67
- Riera C, Valladares JE, Gállego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrió J, Alberola J, Arboix M (1999) Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 84:33–47
- Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Molina I, Gállego M, Portús M (2004) Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:899–904. doi:10.1007/s10096-004-1249-7
- Rioux JA, Guilvard E, Gállego J, Moreno G, Pratlong F, Portús M, Rispaill P, Gállego M, Bastien P (1986) Intervention simultanée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *P. perniciosus* Newstead 1911 dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propós d'une enquête en Catalogne (Espagne). In: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse* I.M.E.E.E., Montpellier, pp 439–444
- 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. doi:10.1016/j.actatropica.2007.10.005
- Sacks DL (2001) *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiol* 3:189–196. doi:10.1046/j.1462-5822.2001.00115.x
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL (2003) PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47:349–358. doi:10.1016/S0732-8893(03)00093-2
- Van Eys GJJM, Schoone GJ, Kroon Nel CM, Ebeling SB (1992) Sequence analysis of small ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 51:133–142
- Velo E, Papparisto A, Bongiorno G, Di Muccio T, Khoury C, Bino S, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M (2005) Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. *Parasite* 12:45–49
- Volf P, Hostomska J, Rohousova I (2008) Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite* 15:237–243
- World Health Organization (2010) Control of Leishmaniases. WHO Technical Report Series no. 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010

IV.2.- CAPÍTULO 2

Temporal trends in canine leishmaniosis in the Balearic Islands (Spain): A veterinary questionnaire. Prospective canine leishmaniosis survey and entomological studies conducted on the Island of Minorca, 20 years after first data were obtained.

M.M. Alcover, C. Ballart, T. Serra, X. Castells, A. Scalone, S. Castillejo, C. Riera, S. Tebar, M. Gramiccia, M. Portús, M. Gállego.

Acta Tropica, 2013, 128 (3): 642-651. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.09.008.

La leishmaniosis está presente en la región mediterránea de Europa, donde la especie responsable es *Leishmania infantum*, los perros son el principal reservorio y los flebotomos del género *Phlebotomus*, subgénero *Larroussius*, son vectores probados. Algunas áreas, incluyendo la isla de Menorca del archipiélago Balear, se consideran libres de la enfermedad, a pesar de la presencia de vectores en ellas. En el contexto de la actual expansión de la leishmaniosis canina en distintas zonas europeas, se realizó un estudio epidemiológico, utilizando un cuestionario veterinario, para establecer la situación actual de la enfermedad en las Islas Baleares. Mientras que el 50% del conjunto de los veterinarios pensó que la incidencia de la leishmaniosis canina no había cambiado a lo largo del tiempo, el 26,2% percibió una tendencia creciente, principalmente en la isla de Menorca, donde el 88,1% de los encuestados consideró que los nuevos casos diagnosticados eran autóctonos. En un estudio serológico transversal realizado en la isla se obtuvo una tasa de seroprevalencia del 24%. La seroprevalencia observada en los animales de origen local y sin antecedentes de movimientos a zonas endémicas fue del 31%. La presencia de la leishmaniosis canina autóctona en Menorca no se correlacionó con un aumento en la densidad del vector. Se discuten los factores ambientales y climáticos que influyeron en la distribución y densidad de *Phlebotomus perniciosus* en la isla y las posibles causas de la aparente aparición de leishmaniosis canina en Menorca.



Temporal trends in canine leishmaniosis in the Balearic Islands (Spain): A veterinary questionnaire. Prospective canine leishmaniosis survey and entomological studies conducted on the Island of Minorca, 20 years after first data were obtained



M.M. Alcover^{a,b}, C. Ballart^{a,b}, T. Serra^c, X. Castells^d, A. Scalone^e, S. Castillejo^{a,b}, C. Riera^a, S. Tebar^{a,b}, M. Gramiccia^e, M. Portús^a, M. Gállego^{a,b,*}

^a Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Palma de Mallorca, Spain

^d Service of Genomics and Bioinformatics, Parc de Recerca UAB MRB-IBB, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

^e Section of Vector-Borne Diseases and International Health, MIPI Department, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2013

Received in revised form 4 September 2013

Accepted 9 September 2013

Available online 17 September 2013

Keywords:

Canine leishmaniosis

Veterinary questionnaire

Serology

Phlebotomus perniciosus

Balearic Islands

Minorca

ABSTRACT

Leishmaniosis is present in the Mediterranean region of Europe, where *Leishmania infantum* is responsible for the disease, dogs are the main reservoir, and sand flies of the *Phlebotomus* genus, subgenus *Larroussius*, are proven vectors. Some areas, including Minorca in the Balearic Islands, are considered free of the disease, despite the presence of vectors. However, in the context of the current expansion of canine leishmaniosis in parts of Europe, an epidemiological study using a veterinary questionnaire was carried out to establish the current situation of the disease in the Balearic Islands. While 50% of veterinarians thought that the incidence of canine leishmaniosis had not changed over time, 26.2% perceived an increasing trend, mainly those from Minorca, where most of the veterinarians polled (88.1%) considered the new diagnosed cases as autochthonous. A cross-sectional serological study performed in this island gave a seroprevalence rate of 24%. Seroprevalence among animals of local origin and with no history of movements to endemic areas was 31%. The presence of autochthonous canine leishmaniosis in Minorca was not correlated with an increase in vector density. The environmental and climatic factors that influenced the distribution and density of *Phlebotomus perniciosus* on the island and the possible causes of the apparent emergence of canine leishmaniosis in Minorca are discussed.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniosis is present in the Mediterranean region of Europe, where *Leishmania infantum* is the causative agent of the disease (Alvar et al., 2004; Gállego, 2004). In the Balearic Islands, human (HL) and canine leishmaniosis (CanL) are considered to be highly endemic (Pujol et al., 2007; Riera et al., 2008).

Despite this, on the island of Minorca only one official case of HL has been recorded, corresponding to a cutaneous form in a 16-month-old child who had previously travelled to Ibiza (Boletín Epidemiológico Semanal, 1978–1994; Fulls setmanals de Vigilància Epidemiològica, 2002–2013). Three cases of HL in Minorca are

recorded in the literature: one visceral case in a 23-year-old woman from Almeria (Spain), a cutaneous case in a young man from Valencia (Spain), another visceral case in a patient who had not left Minorca for 13 years, which was considered a possible reactivation of a cryptic leishmania infection acquired in Catalonia (Portús et al., 1994). Additionally, it is recorded a suspected case of infection detected through serological test in a blood donor during an epidemiological study carried out on the island without any history of travelling abroad (Riera et al., 2008).

Dogs are the domestic reservoir for *L. infantum* (Ashford and Bettini, 1987; Alvar et al., 2004; Gállego, 2004; Maroli et al., 2012). Despite the recommendations of the World Organization for Animal Health (OIE), which includes leishmaniosis in the list of notifiable terrestrial and aquatic animal diseases, there is no official data on the distribution and prevalence of CanL in Spain. The few published records of CanL in the Balearic Islands give rates of infection ranging from 0.9% to 77%, according to the island, the characteristics of the sample, and the diagnostic technique used

* Corresponding author at: Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 934024502; fax: +34 934024504.

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

(Matas-Mir and Rovira-Alos, 1989; Seguí, 1991; Portús et al., 1994; Solano-Gallego et al., 2001; Pujol et al., 2007; Cabezón et al., 2010). Unlike the other islands, the seroprevalence of CanL in Minorca is very low (0.9%), and the few published studies consider the disease as non autochthonous, since the few dogs found to be seropositive were all from endemic areas in Spain (Seguí, 1991; Portús et al., 1994).

Nevertheless, entomological studies have shown that the main proven vector of leishmaniosis in Spain, *Phlebotomus perniciosus*, is present in all the Balearic Islands, including Minorca (Gil Collado et al., 1989; Seguí, 1991; Gállego Berenguer et al., 1992; Portús et al., 1994).

Several factors have been considered as responsible for the emergence or reemergence of leishmaniosis, including globalization, climatic changes, increasing vector density, and the introduction of parasitized dogs from endemic areas (Seguí, 1991; Portús et al., 1994; Gállego, 2004; Ready, 2010; Gramiccia, 2011; Hartemink et al., 2011; Maroli et al., 2012). Emergence has been demonstrated in several foci in Europe (Dereure et al., 2009; Martín-Sánchez et al., 2009; Morosetti et al., 2009; Gálvez et al., 2010b; Branco et al., 2013), while in others it could not be proved due to an absence of preliminary data or the unknown origin of dogs (Miró et al., 2012; Ballart et al., 2013).

With the aim of investigating the current situation of CanL in the Balearic Islands using a standardized methodology, we distributed the EDEN (Emerging Diseases in a changing European eNvironment) veterinary questionnaire to veterinarian pet clinics. The results obtained from Minorca then prompted us to carry out an entomological and cross-sectional study on CanL seroprevalence in this island.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The Balearic Islands are an archipelago located in the western Mediterranean region comprising four main islands (Majorca, Minorca, Ibiza and Formentera) and several smaller islands and islets. The geological origin of the Balearic Islands, with the exception of Minorca, is understood as a continuation of the Baetic Mountains, while Minorca is a continuation of the Pyrenees (Martín-Algarra and Vera, 2004). Apart from the high mountains of Majorca, the Balearic Islands have a Mediterranean climate.

In 2011, the Balearic Islands had a population of 1,093,568 inhabitants, with the majority living on Majorca (862,425 inhabitants), followed by Ibiza (129,562), Minorca (92,434) and Formentera (9147) (<http://www.ibestat.cat/ibestat/page?lang=ca>). The canine census in 2012 was of 250,596 dogs, with 13,956 on the island of Minorca (data provided by the *Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears*).

2.2. Canine leishmaniosis

2.2.1. Veterinary questionnaire survey

In 2009, to investigate the level of CanL awareness among local veterinarians in the Balearic Islands, a standard questionnaire employed in the EDEN Project (Gálvez et al., 2010b; Farkas et al., 2011; Ballart et al., 2013) was translated into the official local languages (Spanish and Catalan) and sent out by mail with pre-stamped envelopes to facilitate return. A conference was previously organized with the help of the *Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears* to encourage veterinarians with pet clinics to become involved in the study. A total of 111 veterinary clinics were consulted. The questionnaire included questions about the kind of clientele, number of suspected and confirmed cases of

CanL, symptoms and frequency with which they were observed, method of diagnosis, and the veterinarians' perception of the disease, including trends in CanL prevalence and control measures used (Gálvez et al., 2010b). A telephone call was made when no answer to the questionnaire was received. The questionnaire responses were transferred into a database in excel format and the locations of veterinary clinics were geocoded using Google Earth.

2.2.2. Cross-sectional study of canine leishmaniosis

A cross-sectional study on CanL was performed in April–June 2010 on 121 dogs from the island of Minorca by serological methods. The animals were selected, with permission from the owners, by the practitioners of three veterinary clinics located in different areas of Minorca (Mercadal, Ciutadella and Sant Lluís) (Fig. 1). To detect autochthonous cases of naturally acquired CanL, veterinarians were asked to select animals born on the island and without any history of travelling abroad regardless of the presence of clinical signs.

Blood samples, obtained by cephalic vein puncture, were collected in 5 ml tubes and sera obtained by centrifugation was frozen and conserved at -40°C until use.

2.2.3. Serological analysis

As in other studies, we used four serological techniques: an in-house Immunofluorescent Antibody Test (IFAT), an in-house Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), an in-house Western Blot (WB) technique, and a commercial Immunochromatographic Test (ICF) (Ballart et al., 2013). Dogs that tested clearly positive with at least two immunological methods were considered seropositive and probably infected (Iniesta et al., 2002; Ballart et al., 2013). Dogs that tested positive with at least two techniques but were borderline were considered doubtful.

2.2.3.1. Speed Duo Leish K. A rapid and feasible commercial immunochromatographic dipstick test (ICF) for use in the field to detect anti-*Leishmania* kinsin antibodies (Speed® Leish K, BVT Group, Virbac) was used. The test was carried out on the serum following the manufacturer's instructions.

2.2.3.2. In-house Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. An in-house Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) previously proven to be useful in epidemiological studies was performed as previously described, with some modifications (Riera et al., 1999). Briefly, sonicated promastigotes of a *Leishmania infantum* strain (MHOM/FR/LEM75/MON1) were used at a protein concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0.05 M carbonate buffer at pH 9.6. Sera were diluted to 1:400 in phosphate buffered saline-tween 1% milk (Sigma, St. Louis, MO, USA) and Protein A peroxidase (Sigma) (1:30,000) was used instead of the second antibody. The reaction was stopped with H_2SO_4 3 M and the optical densities were measured at 492 nm using a Titertek Multiskan PlusMKII (Flow Laboratories International, SA, Lugano, Switzerland). The reaction was quantified in units (U) by reference to a positive serum arbitrarily set at 100 U. The cut-off was established at 24 U (Riera et al., 1999).

2.2.3.3. Western Blotting. An in-house Western Blotting (WB) technique previously proven to be useful and highly sensitive in epidemiological studies was performed as described elsewhere, with some modifications (Riera et al., 1999). A concentration of 3×10^8 promastigotes/ml (*L. infantum* (MHOM/FR/LEM75/MON1)) in sample buffer (0.5; Tris-HCl, pH 6.8, 0.01 M EDTA, 5% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.0125 bromophenol blue) boiled for 5 min was used as the antigen. Electrophoresis on a Mini-gel AE 6400 Dual Mini Slab Kit (Atto, Bunkyo-Ku, Japan) was performed on

0.1% SDS-12% polyacrylamide gel to separate the different antigenic fractions. Polypeptides were trans-blotted onto nitrocellulose sheets (0.45-mm pore size, HAWP 304 FO; Millipore, Bedford, USA). The sera were diluted to 1:50 in Tris-buffered saline-tween 1% milk (Sigma), and Protein A peroxidase (1:1000) was used instead of the second antibodies. The reaction was considered positive when immunoreactivity against any of the polypeptide fractions of 14, 16, 18 and 24 kDa was observed (Aisa et al., 1998; Ballart et al., 2013).

2.2.3.4. Indirect Immunofluorescent Antibody Test. An in-house Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) was performed as described by Gradoni and Gramiccia (2008) for the Office International des Epizooties (OIE) standard procedures. Cultured promastigotes of the WHO reference strain MHOM/TN/80/IPT1 of *L. infantum* were used as the antigen source at a concentration of 4×10^6 promastigotes/ml in phosphate buffer pH 7.2. Sera were used at double serial dilutions from 1:40 to 1:5120 and fluorescein isothiocyanate (FITC) rabbit anti-dog IgG (Sigma-Aldrich Chemical, Germany) diluted 1:40 was used as the conjugate. The 1:160 serum dilution showing fluorescent promastigotes was taken as the positive threshold antibody titre according to several authors (Dereure et al., 2009; Martín-Sánchez et al., 2009; Gálvez et al., 2010b; Morales-Yuste et al., 2012).

2.3. Entomological study

On July 2–8, 2009, sticky traps (20 cm \times 20 cm) were placed in 37 stations distributed throughout the island of Minorca (Fig. 1) following the methodology implemented by the members of EDEN project. Traps were placed in the same capture sites used in a previous study in 1988 (Seguí, 1991). Sticky trap captures were carried out for 4 consecutive nights.

Sand flies were removed from the sticky traps with a brush and fixed in 96% ethanol to remove the castor oil, and then placed in 70% ethanol until identification. All males and *Sergentomyia* females were observed and identified under a stereo microscope, while females of the genus *Phlebotomus* were mounted on glass slides in Hoyer's medium and identified in an optical microscope using the keys of Gállego Berenguer et al. (1992).

2.4. Data collection of environmental and meteorological variables

The characteristics of the stations and sampling methodology (site location, type of trap, number of traps placed and collected, and meteorological data for the days of capture) and ecological and environmental factors were recorded in a PDA using the Pen-dragon Forms v.5.0 software associated with a GPS to record the coordinates of the sampling site.

Meteorological data (temperature, rainfall, relative humidity and wind) were provided by the Spanish Meteorological Agency (AEMet) from the data obtained in the 6 meteorological stations in the study area. Data from the closest meteorological station were assigned for each sampling site using the spatial join-and-relate tool of ArcGis v.9.2 software and included temperature and relative humidity mean values for different periods: (i) period 1 (Sampling Day 1, when traps were set, to Day 4, when traps were recovered), (ii) period 2 (the month before Sampling Day 1) and (iii) period 3 (the year before sampling Day 1). Average rainfall for the month and year before Sampling Day 1 was introduced in the analysis as well as the average minimum winter temperature and the wind speed of period 1.

2.5. Statistical analyses

All computations were performed using the R free software (R Development Core Team, 2012). A multinomial model based on the *multinom* function, which is available in the package *nnt*, was used to compare the odd ratios (OR) for the serological detection of *Leishmania* in dogs. The statistical significance of each OR was computed using a z test ($Pr(>z)$) and differences of ORs between villages for a given serological level were assessed using the χ^2 -based test. The variables included in the study were: site category, closest settlement, aspect, slope, wall sheltered, water course nearby, wall construction, hole construction (unlined or lined), hole interior, vegetation on the wall, well present nearby, refuse bin present nearby, general environment, nearby general vegetation (100 m to 1 km), adjacent flora (within 100 m), seen dogs, seen birds, seen cats, seen farm animals (equines, pigs, cattle), capture *Sergentomyia minuta*, climatic variables (mean daily temperature period 1, mean daily temperature period 2, mean relative humidity period 1,

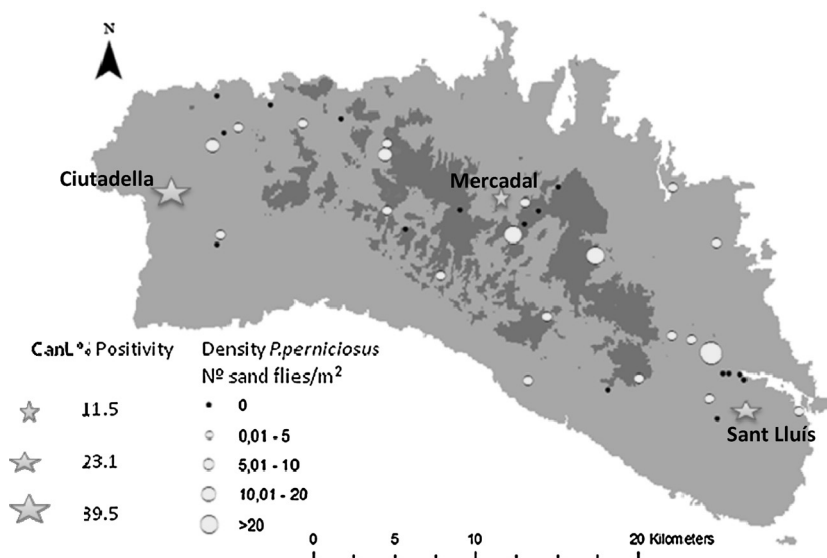


Fig. 1. Sand fly sampling sites in Menorca showing the density of *P. perniciosus* and the seroprevalence of CanL from the veterinarian clinics.

mean relative humidity period 2, rainfall average period 2, rainfall average period 3 and wind speed period 1).

The effect of the different variables on the density of *P. perniciosus* was assessed by generalized linear models based on the negative binomial distribution, which is implemented in the function `glm.nb` from the MASS package (Hilbe, 2007). The exponential transformation of estimates provided by these models gives an incidence risk ratio (IRR), which was interpreted as the probability of finding *P. perniciosus* as done by Gálvez et al. (2010a). Bivariate models were computed for a set of variables of interest, both numeric and categorical. Variables resulting into a $\text{Pr}(z) < 0.2$ were selected to fit two multivariate models. The Likelihood-ratio test (through a χ^2 statistic) was performed to assess that the coefficients from a given model were different from those from the null model, or equivalently, this test assesses whether at least one of the estimated exponential coefficients is different from zero.

Meteorological information collected in 1988 and 2009 was compared out using a linear regression model through the generic function `lm` and statistical significances were assessed using the Student *t* test ($\text{Pr}(t)$). Confidence intervals for all models were estimated using the `ci` function from the `gmodels` package.

3. Results

3.1. Canine leishmaniosis

3.1.1. Veterinary questionnaire survey

42 out of 111 questionnaires sent to local veterinarians were returned completed, giving a reply rate of 38%. The global results and those from individual islands are included in Table 1. The majority of clientele were from a mixed rural/urban environment (66.6%), regardless of island. Over 80% of surveyed veterinary clinics attended more than 20 dogs a week, and more than half of these (73.8%) had confirmed more than 10 cases of CanL-infected dogs in the last 12 months. The majority of the veterinarians (88.1%) considered the new diagnosed cases as autochthonous. While 50% of veterinarians thought that CanL prevalence had not changed over time, 26.2% (50% in Minorca) perceived an increase. No statistical differences were observed between islands. Only two of the veterinarians had diagnosed CanL based exclusively on epidemiological and/or clinical data, while the remainder preferentially used serological methods (95.2%) and/or parasitological techniques (54.8%). Confirmation of diagnosis was carried out both in the veterinarian's own laboratory (66.6%) as well in a private laboratory (69%). Molecular diagnosis was performed only in a few cases (26.2%). In the veterinary clinics, the clinical signs of asthenia, scaly skin and adenopathies were the symptoms frequently or very frequently seen (97.1%, 95.2% and 90.4%, respectively) in dogs and were considered by the veterinarians to have a good diagnostic value.

95.2% of the practitioners recommend prophylactic measures to prevent CanL, principally collars (92.8%) and spot-on products (76.2%), which include repellent effects specifically against sand flies (90.5%) (Table 1).

3.1.2. Prospective canine leishmaniosis survey

Of the 95 animals with known origin and travel history, 69 (72.6%) were born in Minorca and had never left the island.

According to the established criteria for CanL diagnosis, 24% of the animals analyzed in Minorca were considered positive and 10% were considered doubtful (Table 2).

Seropositivity ranged from 12 to 40%, depending on the veterinarian clinic, and the differences found between villages were statistically significant ($p = 0.006$). Differences between villages in CanL risk for dogs are shown in Table 2. Seroprevalence in animals with a lifetime spent on the island was 31%.

3.2. Entomological study

3.2.1. Cross sectional survey (2009)

In July 2009, we captured 1290 specimens of 3 sand fly species in Minorca: *P. perniciosus*, *Phlebotomus sergenti* and *S. minuta*. The number, sex ratio, relative abundance, density and frequency of the species are shown in Table 3 and the geographical distribution of the potential leishmaniosis vector in the island, *P. perniciosus*, is presented in Fig. 1.

3.2.1.1. Bivariate analysis. The bivariate analysis of the variables associated with *P. perniciosus* density gave a $p < 0.2$ for 14 categories and significant differences for site category ($p = 0.015$), nearby water course ($p = 0.025$), wall construction ($p = 0.006$), adjacent flora (within 100 m) ($p = 0.032$), presence of cats ($p = 0.011$) and capture of *S. minuta* ($p = 0.0001$) in the capture site (Table 4). *P. perniciosus* density was significantly higher in rural than in non rural locations (IRR = 8.7), in stone walls constructed with mortar versus dry stone walls (IRR = 5.61), in the presence versus absence of cats (IRR = 9.54) and in collecting sites where *S. minuta* was captured versus those without capture (IRR = 1.19). In contrast, the density of *P. perniciosus* showed a negative correlation with the presence of a nearby water course versus absence (IRR = 0.07) and with the presence of arable adjacent flora (within 100 m) versus natural vegetation (IRR = 0.24).

3.2.1.2. Multivariate analysis. The multivariate model includes the 14 variables with a p -value < 0.2 in the bivariate model. The analysis gave significant results for three variables (Table 4). Wall construction ($p = 0.002$) and presence of cats ($p = 0.001$) continued to show a positive correlation with *P. perniciosus* density (stone and mortar IRR = 4.13 and presence of cats IRR = 16.4) and a negative correlation with adjacent flora (within 100 m) ($p = 0.035$, arable IRR = 0.29). No significant differences were found for site category ($p = 0.777$) and water course ($p = 1$), while in the multivariate analysis a negative correlation was found when the site (aspect) was west-facing as opposed to north-facing ($p = 0.017$, IRR = 0.08).

3.2.2. Changes over time (1988 and 2009)

The number of traps recovered in 2009 was lower than in 1988, the surface of capture being 54.32 m² and 65.52 m² of sticky traps, respectively.

The number of sand flies captured in 1988 was 1525 (24.38 fleb/m²), and in 2009 it was 1290 (23.74 fleb/m²) (Table 3), corresponding to the 3 mentioned species (*P. perniciosus*, *P. sergenti* and *S. minuta*). In the two studies, the density of *S. minuta* varied from 14.3 to 20.5 specimens/m² of sticky trap while *P. sergenti* varied from 3.1 to 0.4 specimens/m².

The density of *P. perniciosus* was significantly lower in 2009 than in 1988 ($p = 0.034$, IRR = 0.41) (Table 5), specifically in rural areas, where the probability of capturing *P. perniciosus* in 2009 had decreased by 60% (IRR = 0.41) in comparison with 1988. In neither year were any statistical differences observed in *P. perniciosus* density in relation with the closest settlement or an increased *S. minuta* density. Of the climatic variables analyzed in 2009 (mean daily temperature periods 1 and 2, average minimum winter temperature, mean relative humidity periods 1 and 2, rainfall average periods 2 and 3 and wind speed), only the mean monthly temperature before sampling (period 2) showed a negative correlation with *P. perniciosus* density ($p = 0.016$, IRR = 0.95). The results of the model of meteorological variables, using negative binomial distribution to estimate the differences between 2009 and 1988, are represented in Table 6. This model showed significant differences for the mean temperature of the month before sampling ($p = 0.002$, 0.9 °C decrease), the average of the minimum winter temperature ($p = 1.93 \times 10^{-10}$, 1.4 °C decrease), the relative

Table 1
Results obtained from the veterinary questionnaire surveying the Balearic Islands autonomous community.

	Majorca N (%) 28/71 (39%)	Minorca N (%) 6/22 (27%)	Ibiza N (%) 7/16 (44%)	Formentera N (%) 1/2 (50%)	Balearic Islands N (%) 42/111 (38%)
Clientele environment					
Urban	11 (39.3)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	12 (28.6)
Rural	1 (12.5)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	2 (4.8)
Mixed	16 (57.1)	6 (100)	6 (85.7)	0 (0)	28 (66.6)
Dogs examined per week (last 12 months)					
4–10	3 (10.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (7.1)
11–20	2 (7.1)	1 (16.6)	1 (14.3)	0 (0)	4 (9.5)
>20	23 (82.2)	5 (83.4)	6 (85.7)	1 (100)	35 (83.4)
Dogs suspected (last 12 months)					
1–5	2 (7.1)	1 (16.6)	1 (14.3)	0 (0)	4 (9.5)
6–10	1 (3.6)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	2 (4.8)
11–20	5 (17.9)	2 (33.4)	0 (0)	0 (0)	7 (16.6)
21–50	11 (39.3)	2 (33.4)	2 (28.6)	1 (100)	16 (38.1)
>50	9 (32.1)	1 (16.6)	3 (42.8)	0 (0)	13 (31)
Confirmed cases of CanL (last 12 months)					
0	1 (3.6)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	2 (4.7)
1–5	3 (10.7)	1 (16.6)	1 (14.3)	0 (0)	5 (12)
6–10	2 (7.1)	2 (33.4)	0 (0)	0 (0)	4 (9.5)
11–20	8 (28.6)	1 (16.6)	0 (0)	1 (100)	10 (23.8)
21–50	9 (32.1)	2 (33.4)	2 (28.6)	0 (0)	13 (31)
>50	5 (17.9)	0 (0)	3 (42.8)	0 (0)	8 (19)
New cases of CanL (last 12 months)					
0	1 (3.6)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	2 (4.8)
1–5	4 (14.3)	1 (16.6)	1 (14.3)	0 (0)	6 (14.3)
6–10	7 (25)	2 (33.4)	0 (0)	1 (100)	10 (23.8)
11–20	11 (39.3)	2 (33.4)	1 (14.3)	0 (0)	14 (33.4)
21–50	2 (7.1)	1 (16.6)	4 (57.1)	0 (0)	7 (16.6)
>50	3 (10.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (7.1)
Dogs infected in the area (last 12 months)					
Not answered	4 (14.3)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	5 (11.9)
Yes	24 (85.7)	6 (100)	6 (85.7)	1 (100)	37 (88.1)
No	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Trends in the number of CanL cases (last 10 years)					
Not answered	1 (3.6)	0 (0)	2 (28.6)	0 (0)	3 (7.2)
Increasing	8 (28.6)	3 (50)	0 (0)	0 (0)	11 (26.2)
Decreasing	2 (7.1)	1 (16.6)	3 (42.8)	1 (100)	7 (16.6)
No evolution	17 (60.7)	2 (33.4)	2 (28.6)	0 (0)	21 (50)
Diagnostic methods					
Epidemiology					
Yes	3 (10.7)	2 (33.4)	1 (14.3)	0 (0)	6 (14.3)
Clinical signs only					
Yes	4 (14.3)	1 (16.6)	0 (0)	0 (0)	5 (11.9)
Serological					
Yes	27 (96.5)	6 (100)	6 (85.7)	1 (100)	40 (95.2)
Serology-IFAT					
Yes	18 (64.3)	2 (33.4)	4 (57.1)	0 (0)	24 (57.1)
Serology-ELISA					
Yes	11 (39.3)	1 (16.6)	2 (28.6)	1 (100)	15 (35.7)
Serology-ICF					
Yes	12 (42.9)	5 (83.4)	4 (57.1)	1 (100)	22 (52.4)
Parasitological					
Yes	14 (50)	3 (50)	4 (57.1)	0 (0)	23 (54.8)
Parasitological-Microscopy lymph node					
Yes	13 (46.4)	3 (50)	4 (57.1)	0 (0)	20 (47.6)
Parasitological-Microscopy bone marrow					
Yes	9 (32.1)	2 (33.4)	5 (71.4)	0 (0)	16 (38.1)
Parasitological-Microscopy skin biopsy					
Yes	7 (25)	2 (33.4)	0 (0)	0 (0)	8 (19)
PCR					
Yes	7 (25)	1 (16.6)	3 (42.9)	0 (0)	11 (26.2)
Place where diagnosis was confirmed					
Own laboratory					
Yes	17 (60.7)	6 (100)	4 (57.1)	1 (100)	28 (66.6)
Private laboratory					
Yes	21 (75)	3 (50)	4 (57.1)	1 (100)	29 (69)
Departmental veterinary laboratory					
Yes	3 (10.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (7.1)
Preventive measures recommended					
Yes	27 (96.4)	6 (100)	6 (85.7)	1 (100)	40 (95.2)
Collar					
Yes	26 (92.8)	6 (100)	6 (85.7)	1 (100)	39 (92.8)
Spot-on					
Yes	23 (82.1)	4 (66.6)	4 (57.1)	1 (100)	32 (76.2)
Spray					
Yes	3 (10.7)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	4 (9.5)
Shampoo					
Yes	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Preventive products specifically against sand flies					
Not answered	2 (7.1)	0 (0)	2 (28.6)	0 (0)	4 (9.5)
Yes	26 (92.9)	6 (100)	5 (71.4)	1 (100)	38 (90.5)

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

Table 2

CanL seroprevalence and multinomial model results from seropositive and doubtful dogs from three veterinary clinics of Minorca (Balearic Islands).

Location	Dogs analyzed (number)	Positive dogs (percentage)	Doubtful dogs (percentage)	Multinomial model			
				OR positives (95% CI)	p-Value	OR doubtful (95% CI)	p-Value
Minorca	121	23.96	9.91				
Mercadal	52	11.5	5.8	Ref.		Ref.	
Sant Lluís	26	23.1	11.5	2.529 (0.715–8.946)	0.075	2.529 (0.464–13.790)	0.142
Ciudadella	43	39.5	13.9	6.092 (2.087–17.782)	4.73×10^{-4}	4.300 (0.975–18.965)	0.027
Pr(χ^2)				0.006		0.394	

Abbreviations: OR, odds ratio; CI, confidence interval; p-Value, Pr(>z); Pr(χ^2), χ^2 test; Ref., reference.**Table 3**

Number, sex ratio, abundance, density and frequency of sand fly species captured in 2009. Comparative results between 2009 and 1988.

	<i>S. minuta</i>		<i>P. sergenti</i>		<i>P. perniciosus</i>	
	2009	1988 ^a	2009	1988 ^a	2009	1988 ^a
Number	1090	937	21	167	179	421
Sex ratio (M:F)	1.1:1	1:1.4	9.5:1	7.8:1	8.5:1	16.5:1
Relative abundance (%) ^b	84.5	61.4	1.6	10.9	13.9	27.4
Frequency (%) ^b	59.4	51.3	21.6	32.1	56.8	64.8
Density ^b	20.5	14.3	0.4	2.5	3.4	6.4

^a Data obtained from Seguí (1991). Estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la isla de Menorca. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.^b Relative abundance: relative number of sand flies of one species related to the total number of sand flies captured expressed in percentage (%). Frequency: relative number of positive stations related to the total number of stations sampled expressed in percentage (%). Density: number of specimens captured per square metre of sticky trap.

humidity of the month before sampling ($p = 1.032 \times 10^{-28}$, decreased by 6.3% RH), annual average rainfall of the year before sampling ($p = 1.231 \times 10^{-11}$, increased by 3.79 tenths of a millimetre) and wind speed of the sampling period ($p = 3.434 \times 10^{-5}$, decreased by 2.4 km/h).

4. Discussion

4.1. Canine leishmaniosis

4.1.1. Veterinary questionnaire survey

The number of questionnaires sent to the practitioners corresponded to the number of veterinary pet clinics in the Balearic Islands in 2009. The clinics were distributed among all the islands and a 38% response rate to the questionnaires was obtained. In other European studies using this methodology, the response rate has varied from 23% to 83.3% (Morosetti et al., 2009; Ruiz de Ybáñez et al., 2009; Farkas et al., 2011; Gálvez et al., 2011; Ballart et al., 2013) and, as also observed in the present work, was independent of veterinary opinion on CanL trends.

Studies of CanL evolution in the Mediterranean region performed with the EDEN methodology have given different results for veterinarian opinions on increasing or decreasing trends of the disease (Morosetti et al., 2009; Ruiz de Ybáñez et al., 2009; Gálvez et al., 2010b; Ballart et al., 2013). In the present study, 50% of veterinarians thought that the incidence of CanL in the Balearic Islands has remained unchanged in the last 10 years. Nevertheless, this result largely reflects the opinion of veterinarians in Majorca, the source of the majority of completed questionnaires. In contrast, we noted that 3 of the 6 veterinarians in Minorca who completed the questionnaire believed that CanL was increasing in the island, while none thought the disease was decreasing, although the low number of answers prevents statistical significance being given to this observation. Thus, in accordance with previous knowledge of CanL in the Balearic Islands, our survey produced variable results among the different islands, which corresponds with observations by other authors (Morosetti et al., 2009; Ruiz de Ybáñez et al., 2009; Gálvez et al., 2010b; Ballart et al., 2013).

A high percentage of the veterinarians polled thought that CanL cases detected were acquired locally, independently of the island

considered, which overturns the previous idea of an absence of leishmaniosis transmission in Minorca.

Most of the canine population treated at the veterinarian clinics in the Balearic Islands was from a mixed environment (66.6%), the clientele being more rural in the smaller islands and more urban in Majorca. Very few cases of CanL were diagnosed only on the basis of epidemiological data or clinical signs, probably due to the wide range of clinical signs and the low specificity of the symptoms (Alvar et al., 2004; Gállego, 2004; Solano-Gallego et al., 2009). As in previous surveys performed in other areas of Spain and in Italy (Morosetti et al., 2009; Ruiz de Ybáñez et al., 2009; Gálvez et al., 2011; Ballart et al., 2013), serology was the diagnostic method of choice to confirm a suspicious case (95%), regardless of island (p -value=0.686). Parasitological methods were used to confirm the cases (55%), while the use of molecular techniques was very low (26%), unlike the results obtained by Gálvez et al. (2010b), probably due to the absence of a University Veterinary Hospital or specialized laboratory in the Balearic Islands for sample analysis.

Almost all veterinarians recommended active preventive measures (95.2%), particularly collars and spot-on products, as in other European regions (Morosetti et al., 2009; Ruiz de Ybáñez et al., 2009; Gálvez et al., 2011; Ballart et al., 2013). The high recommendation of specific agents against sand flies (90.5%) by the veterinarians demonstrates knowledge of the disease and its way of transmission, including in Minorca.

4.1.2. Prospective canine leishmaniosis survey

The differences between the results on CanL presence in Minorca obtained in the present work using a veterinary questionnaire and those of previous studies (Seguí, 1991; Portús et al., 1994) prompted us to carry out a cross-sectional study on CanL seroprevalence in the dog population of the island.

The seroprevalence obtained in this study (24%) is high compared with the existing data from other seroepidemiological studies on CanL in Spain (1.6–34.6%) (Morillas et al., 1996; Aisa et al., 1998; Morales-Yuste et al., 2011; Miró et al., 2012; Ballart et al., 2013). Nevertheless, it is necessary to have into account that seroprevalence studies on CanL performed on dogs from veterinary clinics give higher values than in other populations (Botet et al., 1987; Morales-Yuste et al., 2011) due to a biased population of sick

Table 4
Bivariate and multivariate analysis of the environmental and meteorological factors associated with *Phlebotomus perniciosus* density in Minorca (Balearic Islands) in 2009.

Variable	N (%)	Bivariate analysis			Multivariate analysis		
		IRR	p-Value	CI (95%)	IRR	p-Value	CI (95%)
Site category							
Urban	7 (18.9)	Ref.					
Rural (include edge and between locations)	30 (81.1)	8.7	0.015	1.371–52.959			
Aspect							
North-facing	14 (37.8)	Ref.			Ref.		
South-facing	9 (24.4)	0.43	0.244	0.100–1.869	1.02	0.955	0.431–2.427
East-facing	2 (5.4)	2.11×10^{-9}	0.996	0–Inf	0	1	0–Inf
West-facing	4 (10.8)	0.45	0.405	0.064–3.168	0.08	0.017	0.009–0.771
Other (not applicable)	8 (21.6)	0.27	0.085	0.056–1.271	0.78	0.683	0.210–2.885
Slope							
None	26 (70.3)	Ref.					
Shallow (<10%)	10 (27)	2.76	0.115	0.834–11.282			
Steep (>10%)	1 (2.7)	0.67	0.834	0.027–419.855			
Water course nearby (Ref.: no)							
Yes	5 (13.6)	0.07	0.0252	0.004–0.751			
Wall construction							
Stone without mortar/dry stone wall	27 (73)	Ref.			Ref.		
Stone/mortar	7 (18.9)	5.61	0.006	1.793–22.746	4.13	0.002	1.549–11.024
Stone/mortar (plasterer/white)	3 (8.1)	0.18	0.207	0.007–2.773	0	1	0–Inf
Hole interior (Ref.: without vegetation)							
With vegetation	8 (21.6)	0.38	0.203	0.096–2.034			
Refuse bin present nearby (Ref.: no)							
Yes	4 (11)	0.13	0.0787	0.012–1.723			
General environment							
Settlement non rural	32 (86.5)	Ref.					
Rural agriculture and forestry	2 (5.4)	3.15×10^{-9}	0.996	0–Inf			
Rural village	3 (8.1)	0.21	0.189	0.018–2.367			
Nearby natural vegetation (100 m to 1 km)							
Natural vegetation	25 (67.6)	Ref.					
Arable	10 (27)	2.36	0.185	0.706–9.710			
Other (Palm trees, marine)	2 (5.4)	0.26	0.381	0.012–13.230			
Adjacent flora (within 100 m)							
Natural vegetation	25 (67.6)	Ref.			Ref.		
Arable	10 (27)	0.24	0.0319	0.061–0.927	0.29	0.035	0.081–1.024
Other (grounds)	2 (5.4)	2.65×10^{-9}	0.9961	0–Inf	6.056×10^8	1	0–Inf
Seen cats (Ref.: not seen)							
Seen	2 (5.4)	9.54	0.011	2.242–91.704	16.39	0.001	2.616–102.669
Capture <i>S. minuta</i> (Ref.: no)							
Yes	22 (59.5)	1.02	0.0001	1.006–1.039			
Climatic variables							
Mean daily temperature (°C) (period 1) [*]		2.71	0.142	0.772–8.628			
Mean daily temperature (°C) (period 2) ^{**}		0.25	0.213	0.016–2.419			
Rainfall average (mm) (period 2) ^{**}		1.12	0.116	0.997–1.271			
Wind speed (km/h) (period 1) [*]		0.73	0.098	0.503–1.072			

* Period 1: sampling Day 1 (traps set) to Day 4 (traps recovered).

** Period 2: the month before sampling Day 1.

Table 5
Bivariate analysis of the environmental and meteorological factors associated with *Phlebotomus perniciosus* density in Minorca (Balearic Islands) according to the year of capture (2009 and 1988). For all the variables it has been taking as reference the results obtained in 1988.

Variable 2009	IRR	p-Value	CI (95%)
Sampling year	0.41	0.034	0.176–0.945
Site category			
Urban	0.29	0.263	0.031–2.554
Rural (include edge and between locations)	0.41	0.042	0.173–0.979
Meteorological variables			
Mean daily temperature (°C) (period 2) ^b	0.95	0.016	0.920–0.991
Mean relative humidity (%) (period 1) ^a	0.99	0.051	0.975–1.001
Wind speed (km/h) (period 1) ^a	0.91	0.0586	0.814–1.030

Abbreviations: IRR, incidence risk ratio; p-value, Pr (>z); CI, confidence interval; °C, degree Celsius; mm, millimetres; km/h, kilometres per hour; %, percentage.

^a Period 1: sampling Day 1 (traps set) to Day 4 (traps recovered).^b Period 2: the month before sampling Day 1.

animals. The seropositivity observed in Minorca ranged from 12 to 40% depending on the veterinarian clinic, with statistically significant ($p=0.006$) differences existing between villages. The lowest prevalence was found in dogs from the centre of the island, even though sand fly density did not differ statistically among areas. This high seroprevalence suggested that dogs with suspected *Leishmania* infection had been included in the sample and therefore

statistical differences between dogs from different clinics did not reflect the real distribution of the disease in the island. More studies with a higher number of dogs, not based only on those examined at veterinarian clinics, are required. Nevertheless, the seroprevalence (31%) among animals known to be of local origin and without any history of movements to endemic areas confirms the existence of autochthonous CanL in Minorca.

Table 6

Linear model analysis comparing 2009 and 1988 meteorological variables. For all the variables it has been taking as reference the results obtained in 1988.

Climatic variables (2009)	Estimate	p-Value	CI (95%)
Mean daily temperature (°C) (period 2) ^b	−0.91	0.002	−1.485 to −0.342
Average minimum winter temperature (°C)	−1.41	1.930×10^{-10}	−1.794 to −1.033
Mean relative humidity (%) (period 2) ^b	−6.26	1.032×10^{-28}	−6.940 to −5.573
Rainfall average (mm) (period 3) ^c	3.79	1.231×10^{-11}	2.856–4.735
Wind speed (km/h) (period 1) ^a	−2.4	3.434×10^{-5}	−3.481 to −1.317

Abbreviations: IRR, incidence risk ratio; p-value, Pr (>z); CI, confidence interval; °C, degree Celsius; mm, millimetres; km/h, kilometres per hour; %, percentage.

^a Period 1: sampling Day 1 (traps set) to Day 4 (traps recovered).

^b Period 2: the month before sampling Day 1.

^c Period 3: the year before sampling Day 1.

4.2. Entomological study

In the present study, we identified the 3 species of sand flies previously described in Minorca (Seguí, 1991; Gállego Berenguer et al., 1992; Portús et al., 1994), where, as in the other Balearic Islands (Gil Collado et al., 1989; Lladó and Rotger, 1990), *P. perniciosus* is the only species associated with *L. infantum* transmission (Morillas et al., 1996; Barón et al., 2011; Ballart et al., 2012).

4.2.1. Bivariate and multivariate analysis

Several studies have reported the influence of environmental and climatic factors in the distribution of leishmaniosis vectors (Aspöck et al., 2008; Maroli et al., 2008; Gálvez et al., 2010a; Barón et al., 2011; Özbek et al., 2011; Morales-Yuste et al., 2012; Martins-Queiroz et al., 2012; Quintana et al., 2012).

Minorca is a small, mainly rural and agricultural island, with very little variety in vegetation in the rural environment, where the majority of traps were placed. The area is covered by family farms, with cereal crops and pastures mainly for cattle and horses. Traps were placed for a very short period of time at the beginning of July. This uniformity prevented the detection of statistically significant differences in vector distribution caused by environmental and climatic factors, which have been recorded in other studies (Aspöck et al., 2008; Maroli et al., 2008; Gálvez et al., 2010a; Barón et al., 2011; Özbek et al., 2011; Morales-Yuste et al., 2012; Martins-Queiroz et al., 2012; Quintana et al., 2012). A prediction model has shown that this species would be more abundant at lower altitudes in an intervening area of France (Hartemink et al., 2011). Nevertheless, the data collected suggest a positive correlation between *P. perniciosus* density and the rural location, that favours the presence of sand flies by facilitating the right conditions for the terrestrial life cycle (Gálvez et al., 2010a; Barón et al., 2011; Özbek et al., 2011). *P. perniciosus* was found principally in stone mortar walls, as opposed to those without mortar/dry stone. Dry stone walls, which are commonly used to separate farms or land in the rural areas of the island, could discourage sand flies from settling, due to drafts. Additionally, the lack of precise holes hampers the capture of resting sand flies. The density of *P. perniciosus* showed a negative correlation with the presence of a nearby water course (IRR=0.07), in agreement with the preference of this species for semi-arid and sub-humid environments in areas with warm winters and mild summers (Gállego et al., 1990). Its capture also decreased in the presence of adjacent arable flora, where the use of pesticides would have reduced the sand fly population.

The density of *P. perniciosus* showed a positive correlation with the presence of cats, which has not been observed in previous studies that found a positive correlation with other animals (birds, livestock) (Gálvez et al., 2010a). The opportunistic feeding behaviour of *P. perniciosus*, taking blood meals from a range of hosts, has been demonstrated in Minorca (de Colmenares et al., 1995) and other Mediterranean foci (Morosetti et al., 2009; Branco et al., 2013). The positive correlation of *P. perniciosus* density and cats is of epidemiological importance, because cats may act as

additional reservoir hosts of *L. infantum* in southern Europe, including the Balearic Islands (Martín-Sánchez et al., 2007; Ready, 2010; Gramiccia, 2011; Millán et al., 2011) and evidence of transmissibility of feline parasites to a proven vector has been provided (Maroli et al., 2007).

The geographical homogeneity of Minorca (a rural island, with the highest point at 350 m a.s.l. and without variations in vegetation and climate), and the short period of trapping time (one week) resulted in an absence of statistical significance regarding the meteorological variables analyzed and *P. perniciosus* density ($p > 0.05$), in contrast with other studies (Gálvez et al., 2010a; Barón et al., 2011; Özbek et al., 2011).

4.2.2. Changes over time (1988 and 2009)

Vector presence and density, that could be associated to the global change, are considered to be risk factors for the emergence of leishmaniosis in areas free of the disease (Enserink, 2000; Ready, 2010; Ballart et al., 2012; Maroli et al., 2012).

The emergence of CanL due to an increase in vector density has occurred in some regions (Maroli et al., 2008; Martín-Sánchez et al., 2009; Morosetti et al., 2009; Gálvez et al., 2010b). However, in the present study, when capturing sand flies in exactly the same stations as in 1988, we found that the global density of *P. perniciosus* had decreased significantly. This decrease was observed specifically in the rural area with the highest number of stations, giving a higher density of *P. perniciosus*. No evident environmental changes, such as new urbanized areas, road construction, or changes in land use, had occurred in the capture sites since the previous study to explain these results.

Besides environmental changes, climatic conditions have also been observed to influence sand fly density. In the Mediterranean region, most leishmaniosis foci are between isotherms 5 °C and 10 °C in January and 20 °C and 30 °C in July (Ashford and Bettini, 1987). Relatively small changes in temperature could have a considerable impact on vectorial capacity if they affect the frequency of blood intake (Ready, 2010), and the development cycle of *Leishmania* promastigotes in sandflies (Rioux et al., 1985). Rain and humidity determine insect survival and promote adult emergence and suitable oviposition sites (Ready and Croset, 1980), and wind could influence dispersion and activity, with optimal wind speeds for movement being <0.6 m/s (Killick-Kendrick et al., 1984). Of the climatic variables analyzed, the mean temperature of the month before sampling showed a negative correlation with *P. perniciosus* density, being 0.9 °C less in 2009 than 1988. Other climatic variables showing statistical differences between both years (average minimum winter temperature, relative humidity of the month before sampling, annual average rainfall of the year before sampling, and the wind speed of the sampling period) did not correlate with changes in *P. perniciosus* density. Wind has been considered a climatic variable affecting sand fly density when using CDC light traps (Branco et al., 2013) and is known to affect their activity (Killick-Kendrick et al., 1984).

The presence of wind is also considered to have a negative effect on leishmaniosis transmission in the island of Minorca (Portús et al., 1994). Thus, a decrease in wind speed could favour activity of *P. perniciosus* in the island, as well as female life spans and therefore the transmission of leishmania parasites, as mentioned by Portús et al. (1994).

The existence of CanL in conditions of low vector density has been described (Ballart et al., 2013). In the absence of measures in the island to control the entrance of infected dogs from endemic CanL areas, uncontrolled animals could contribute to the increased incidence of the disease, as has been mentioned (Seguí, 1991; Reperant, 2010). In fact, the introduction of infected dogs from endemic areas in the presence of the vector has been considered a risk for CanL emergence in Minorca (Seguí, 1991), and is probably responsible for the increasing number of cases and the suspected establishment of an autochthonous CanL focus on this island. More studies on the vectorial capacity of *P. perniciosus* and that of other non-phlebotomine and non-vectorial ways of transmission need to be performed in Minorca in order to establish their role on the epidemiology of leishmaniosis in this island.

5. Conclusion

Together with previous data on CanL in Minorca, the new results we have obtained by a veterinary questionnaire and a prospective study suggest that the presence of the disease on the island is due to an emergence. Based on these results, the establishment of an autochthonous focus of CanL in Minorca does not seem to be directly related to an increase in *P. perniciosus* density, but rather to the continuous introduction of leishmaniosis-infected dogs, which favours contact with *P. perniciosus* in a rural environment.

Acknowledgements

Work supported by project CGL2007-66943-C02-01/BOS (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Spain) (2009SGR385). Grateful acknowledgement to M.G. Seguí for helping in the location of the stations and A. Lanau for their active participation in the sand fly captures. We thank the veterinarians R. Aranda, M. Hugué and E. Sintés, for their active participation in collecting blood samples of dogs, and the farm owners that allowed us to collect blood samples from their dogs and to capture the sand flies. We are also grateful for the help of the Col·legi de Veterinaris of Balearic Islands, particularly R. García and A. Figueroa, as well as the veterinarians who completed the questionnaires. Thanks are due to J. Abellán, from the *Centre Insular Sanitat Menorca*, who provided data on the human case of leishmaniosis declared in Minorca. Thanks are due to the AEMet, who provided meteorological data, and to the member of the leishmania subproject of EDEN (UE) who designed the veterinary questionnaire and the Pendragon database for field work. EDENext Grant 261504 supported MMA in Rome.

References

- Aisa, M.J., Castillejo, S., Gállego, M., Fisa, R., Riera, C., de Colmenares, M., Torras, S., Roura, X., Sentís, J., Portús, M., 1998. Diagnostic potential of Western Blot analysis of sera from dogs with leishmaniosis in endemic areas and significance of the pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 154–159.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniosis. *Adv. Parasitol.* 57, 1–88.
- Ashford, R.W., Bettini, S., 1987. Ecology and epidemiology: Old World. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. Academic Press, London, pp. 365–424.
- Aspöck, H., Gerersdorfer, T., Formayer, H., Walochnik, J., 2008. Sand flies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wien. Klin. Wochenschr.* 120 (Suppl. 4), 24–29.
- Ballart, C., Barón, S., Alcóver, M.M., Portús, M., Gállego, M., 2012. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta Trop.* 122, 155–159.
- Ballart, C., Alcóver, M.M., Picado, A., Nieto, J., Castillejo, S., Portús, M., Gállego, M., 2013. First survey on canine leishmaniosis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study. *Prev. Vet. Med.* 109, 116–127.
- Barón, S.D., Morillas-Márquez, F., Morales-Yuste, M., Díaz-Sáez, V., Irigaray, C., Martín-Sánchez, J., 2011. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniosis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* 138, 1234–1244.
- Boletín Epidemiológico Semanal, 1978–1994. Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Salud Pública, Ministerio de Sanidad y Consumo, España.
- Botet, J., Serra, T., Portús, M., Mora, R., Gállego, M., 1987. Incidencia de la leishmaniosis en el área de Barcelona. *Rev. Ibér. Parasitol.* Vol. Extra, 51–54.
- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristovão, J.M.S., Gonçalves, L., Campino, L., Afonso, M.O., 2013. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniosis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Trop.* 125, 339–348.
- Cabezón, O., Millán, J., Gomis, M., Dubey, J.P., Ferroglio, E., Almería, S., 2010. Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. *Parasitol. Res.* 107, 1505–1508.
- de Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, M., 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by competitive enzyme-linked immunoadsorbent assay biotin/avidin method. *J. Med. Entomol.* 32, 229–233.
- Dereure, J., Vanwambeke, S., Malé, P., Martínez, S., Pralong, F., Balard, Y., Dedet, J.P., 2009. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniosis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector Borne Zoonot. Dis.* 9, 687–694.
- Enserink, M., 2000. Has leishmaniosis become endemic in the U.S.? *Science* 290, 1881–1883.
- Farkas, R., Táncoz, B., Bongiorno, G., Maroli, M., Dereure, J., Reedy, P.D., 2011. First surveys to investigate the presence of canine leishmaniosis and its Phlebotomine Vectors in Hungary. *Vector Borne Zoonot. Dis.* 11, 823–834.
- Fulls setmanals de Vigilància Epidemiològica, 2002–2013. Servei d'Epidemiologia. Direcció General de Salut Pública i Consum. Conselleria de Salut, Família i Benestar Social, Illes Balears.
- Gállego, M., 2004. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 23, 661–676.
- Gállego Berenguer, J., Botet Fregola, J., Gállego Culleré, M., Portús Vinyeta, M., 1992. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. In: Hernández, S. (Ed.), *In Memoriam al Prof. Dr. D. F. de P. Martínez Gómez*. Publicaciones de la Universidad de Córdoba, pp. 581–600.
- Gállego, M., Rioux, J.A., Rispail, P., Guilvard, E., Gállego, J., Portús, M., Delalbre, A., Bastien, P., Martínez-Ortega, E., Fisa, R., 1990. Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Rev. Ibér Parasitol.* 50, 123–127.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R., 2010a. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop.* 115, 95–102.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E., Molina, R., 2010b. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Vet. Parasitol.* 169, 327–334.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Molina, R., 2011. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Prev. Vet. Med.* 102, 59–65.
- Gil Collado, J., Morillas Márquez, F., Sanchís Marín, M.C., 1989. Los flebotomos en España. *Rev. San. Hig. Púb.* 63, 15–34.
- Gradoni, L., Gramiccia, M., 2008. Leishmaniosis. In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, sixth ed. Office International des Epizooties, Paris, pp. 240–250 (Chapter 2.1.8).
- Gramiccia, M., 2011. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.* 181, 23–30.
- Hartemink, N., Vanwambeke, S.O., Heesterbeek, H., Rogers, D., Morley, D., Pesson, B., Davies, C., Mahamdallie, S., Reedy, P., 2011. Integrated mapping of establishment risk for emerging vector-borne infections: a case study of canine leishmaniosis in Southwest France. *PLoS ONE* 6, e20817, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020817>.
- Hilbe, J.M., 2007. *Negative Binomial Regression*. Cambridge University Press, NY, pp. 264.
- Iniesta, L., Fernández-Barredo, S., Bulle, B., Gómez, M.T., Piarroux, R., Gállego, M., Alunda, J.M., Portús, M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniosis in dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1137–1141.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Bailly, M., Guy, M.W., Wilkes, T.J., Guy, F.M., Davidson, I., Knechtli, R., Ward, R.D., Guilvard, E., Périères, J., Dubois, H., 1984. Ecology of leishmaniosis in the South of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniosis in the Cévennes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59, 555–572.
- Lladó, M.T., Rotger, M.J., 1990. Estudio del flebotomo como vector de la leishmaniosis en la isla de Mallorca. Conselleria de Sanitat i Seguretat Social. Govern Balear, Palma de Mallorca, pp. 109.

- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., 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., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health* 13, 256–264.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2012. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.*, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>.
- Martín-Algarra, A., Vera, J.A., 2004. La Cordillera Bética y las Baleares en el contexto del Mediterráneo Occidental. In: Vera, J.A. (Ed.), *Geología de España*. SGE-IGME, Madrid, pp. 352–354.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., 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., Morillas-Márquez, F., 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 795–798.
- Martins-Queiroz, M.F., Varjão, J.R., Moraes, S.C., Salcedo, G.E., 2012. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 313–317.
- Matas-Mir, B., Rovira-Alos, J., 1989. Estudio epidemiológico de la leishmaniosis canina en la isla de Mallorca. Conselleria de Sanitat i Seguretat Social. Govern Balear, Palma de Mallorca.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 352–357.
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Gálvez, R., 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit. Vectors*, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-60>.
- Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S.D., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Corpas-López, V., Martín-Sánchez, J., 2011. Leishmaniosis en la provincia de Cádiz (sur de España): seroprevalencia y factores de riesgo de la leishmaniosis canina e incidencia en humanos. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 70, 138–144.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Barón-López, S., Acedo-Sánchez, C., Martín-Sánchez, J., 2012. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol. Res.* 111, 155–164.
- Morillas, F., Sanchez Rabasco, F., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocaña-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchiz-Marin, M.C., 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., Maroli, M., 2009. Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. *Geospat. Health* 4, 115–127.
- Özbel, Y., Balcioğlu, I.C., Ölgen, M.K., Şimsek, F.M., Töz, S.Ö., Ertabaklar, H., Demir, S., Alkan, M.Z., 2011. Spatial distribution of phlebotomine sand flies in the Aydin Mountains and surroundings: the main focus of cutaneous leishmaniasis in western Turkey. *J. Vector Ecol.* 36 (Suppl. 1), S99–S105.
- Portús, M., Gállego, M., Seguí, M.G., Sole, J., 1994. Is leishmaniasis endemic on the island of Menorca (Spain)? A human visceral case after living 13 years in Menorca. *Parasite* 1, 87–88.
- Pujol, A., Cortés, E., Ranz, A., Vela, C., Aguiló, C., Martí, B., 2007. Estudi de seroprevalència de leishmaniosis i d'ehrlichiosis a l'illa de Mallorca. *Rev. Col. Ofic. Vet. Illes Balears Vet.* 32, 9–12.
- Quintana, M.G., Fernández, M.S., Salomón, O.D., 2012. Distribution and abundance of phlebotominae, vectors of leishmaniosis, in Argentina: spatial and temporal analysis at Different Scales. *J. Trop. Med.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/652803>, ID 652803.
- R Development Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/> (accessed on 08.02.13).
- Ready, P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 15, pii:19505.
- 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.
- Reperant, L.A., 2010. Applying the theory of island biogeography to emerging pathogens: toward predicting the sources of future emerging zoonotic and vectorborne diseases. *Vector Borne Zoon. Dis.* 10, 105–110.
- Riera, C., Valladares, J.E., Gállego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J., Arboix, M., 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84, 33–47.
- Riera, C., Fisa, R., López-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jiménez, M.T., Muncunill, J., Sedeño, M., Mascaró, M., Udina, M., Gállego, M., Carrió, J., Forteza, A., Portús, M., 2008. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 48, 1383–1389.
- Rioux, J.A., Aboulker, J.P., Lanotte, G., Killick-Kendrick, R., Martini-Dumas, A., 1985. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 21. Influence de la température sur le développement de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 chez *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Étude expérimentale. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 3, 221–229.
- Ruiz de Ybáñez, R., del Río, L., Martínez-Carrasco, C., Segovia, M., Cox, J., Davies, C., Berriatua, E., 2009. Questionnaire survey on Canine Leishmaniasis in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 164, 124–133.
- Seguí, M.G., 1991. Estudi epidemiològic de la leishmaniosis a l'illa de Menorca. *Rev. de Men.* 2, 153–178.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniosis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* 39, 560–563.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 165, 1–18.

IV.3.- CAPÍTULO 3

Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*

M. Magdalena Alcover, Cristina Ballart, Joaquina Martín-Sánchez, Teresa Serra, Soledad Castillejo, Montserrat Portús and Montserrat Gállego.

Parasites & Vectors, 2014, 4; 7(1): 421. doi: 10.1186/1756-3305-7-421

La isla de Mallorca es una zona endémica de leishmaniosis; sin embargo, hasta la fecha hay una falta de datos de su fauna de flebotomos, datando los últimos de 1989. Con el presente estudio se pretendió aportar datos actuales sobre la distribución de los flebotomos, los posibles factores ambientales que favorecen la presencia de los vectores y cuáles son las áreas en riesgo de leishmaniosis. En Julio del 2008 se llevaron a cabo capturas, con trampas de papel adhesivo embebidas en aceite de ricino, para la recolección de flebotomos en dicha isla. Se colocaron un total de 1.882 papeles adhesivos en 111 estaciones, distribuidas en 77 cuadrículas, que cubrían la totalidad de la isla. Se recogieron las características de las estaciones y se confeccionaron mapas con el programa ArcGIS 9.2. Se llevó a cabo un análisis estadístico mediante un modelo de regresión logística uni- y multivariante. La fauna de flebotomos de Mallorca se compone de 4 especies: *Phlebotomus perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *Sergentomyia minuta*. *P. perniciosus*, responsable de la transmisión de *Leishmania infantum*, fue capturado a lo largo de toda la isla (frecuencia de 69,4 %), a intervalos de altura comprendidos entre 6-772 m por encima el nivel del mar. Mediante el estudio estadístico de regresión logística se estimó la probabilidad de la presencia de *P. perniciosus* en cada estación de muestreo en función de las variables ambientales y de los factores meteorológicos. A pesar de que en el análisis univariado inicial la presencia de *P. perniciosus* parecía estar asociada a una amplia variedad de factores, en el modelo de regresión logística multivariante sólo la altitud, la ubicación de la estación de muestreo, la orientación, la construcción del agujero, la flora adyacente y la proximidad

de granjas de ovejas se mantuvieron como factores predictores positivos de la distribución de esta especie. *P. perniciosus* está presente en toda la isla, con el consecuente riesgo de transmisión de la leishmaniosis. La probabilidad de encontrar a esta especie fue mayor a altitudes entre 51-150 m, en presencia de vegetación adyacente de garriga, en los límites de las poblaciones y entre éstas y en la proximidad de granjas de ovejas.

RESEARCH

Open Access

Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*

M. Magdalena Alcover^{1,2}, Cristina Ballart^{1,2}, Joaquina Martín-Sánchez³, Teresa Serra⁴, Soledad Castillejo^{1,2}, Montserrat Portús¹ and Montserrat Gállego^{1,2*}

Abstract

Background: Although the Mediterranean island of Majorca is an endemic area of leishmaniosis, there is a lack of up-to-date data on its sand fly fauna, the last report dating from 1989. The aim of the present study was to provide information on the current sand fly distribution, the potential environmental factors favoring the presence of *Phlebotomus perniciosus* and which areas are at risk of leishmaniosis.

Methods: In July 2008 sand fly captures were carried out in Majorca with sticky castor oil interception traps. The capture stations were distributed in 77 grids (5x5 km²) covering the entire island. A total of 1,882 sticky traps were set among 111 stations. The characteristics of the stations were recorded and maps were designed using ArcGIS 9.2 software. The statistical analysis was carried out using a bivariate and multivariate logistic regression model.

Results: The sand fly fauna of Majorca is composed of 4 species: *Phlebotomus perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* and *Sergentomyia minuta*. *P. perniciosus*, responsible for *Leishmania infantum* transmission, was captured throughout the island (frequency 69.4 %), from 6 to 772 m above sea level. Through logistic regression we estimated the probability of *P. perniciosus* presence at each sampling site as a function of environmental and meteorological factors. Although in the initial univariate analyses the probability of *P. perniciosus* presence appeared to be associated with a wide variety of factors, in the multivariate logistic regression model only altitude, settlement, aspect, drainage hole construction, adjacent flora and the proximity of a sheep farm were retained as positive predictors of the distribution of this species.

Conclusions: *P. perniciosus* was present throughout the island, and thereby the risk of leishmaniosis transmission. The probability of finding *P. perniciosus* was higher at altitudes ranging from 51 to 150 m.a.s.l., with adjacent garrigue shrub vegetation, at the edge of or between settlements, and in proximity to a sheep farm.

Keywords: Leishmaniosis, *Phlebotomus perniciosus*, Risk factors, Majorca Island

* Correspondence: mgallego@ub.edu

¹Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona (Spain), Barcelona, Spain

²Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), UB-Fundació Clínic, Barcelona, Spain

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

Background

The Balearic Islands in the Mediterranean region are considered endemic for both human and canine leishmaniasis, although the presence and prevalence of the diseases varies among the islands [1]. The first data on human leishmaniasis in the Balearic Islands date from 1925 [2], while canine leishmaniasis was first reported in 1989 [3], in both cases in the island of Majorca, where most studies have been conducted.

In certain regions of Spain, human leishmaniasis is an endemic and notifiable disease, including in the Balearic Islands, which in some years have seen the highest registered incidence in Spain (4.72 and 4.59/100,000 in 2005 and 2006 respectively) [4]. Between 7 and 33 cases are declared in Majorca every year [5,6]. As in other parts of Spain, the disease is under-reported, especially cases of cutaneous leishmaniasis [7]; cases of human cryptic leishmaniasis have also been described [8]. Little information is available on the origin of cases [6,8].

The heterogeneous distribution and prevalence of canine leishmaniasis (CanL) ranges from 0% to 45% among different studies and islands [9-11]. A study conducted by the sanitary authorities in Majorca gave a prevalence of 14.4 % [3]. Veterinarians answering a questionnaire on CanL trends in Majorca thought the disease was stable [1] and that autochthonous cases continue to occur, as has been previously described [3,11].

Data on sand fly distribution in the Balearic Islands is scarce [10,12-15]. The most recent data for Majorca corresponds to studies performed in 1987 and 1989 [14], but do not include information about the distribution and density of the different sand fly species throughout the island.

The aim of the present study was to obtain up-to-date entomological data by standardized methods that could be compared with data reported by other teams in different geographical areas of Europe and used in future entomological studies, including those on climate change. In addition, the extensive capture of the vector in the island could provide information on the environmental factors that may potentially favour the presence of *P. perniciosus* and also which areas are at risk of leishmaniasis.

Methods

Area of study

The study was carried out on the island of Majorca (Spain), located at 39°15' to 39°60'N, 2°20' to 3°30'E. Majorca is the largest of the Balearic Islands, covering 3,640 km² and with a coastline of 623 km. Altitudes range from sea level to 1,445 m.a.s.l., most of the island (78.8%) being below 200 m.a.s.l. and only 6.3% above 500 m.a.s.l. The highest mountainous area is the Serra de Tramuntana in the north, which runs parallel to the west coast, protecting the island from the prevailing

west and northwest winds. Bordering the low central plain in the southeast is the Serra de Llevant, with a maximum altitude of 509 m.a.s.l. [16].

The climate is typically Mediterranean, with long periods of invariability. The mean annual temperature is about 16–17°C, except in the Serra de Tramuntana, where it drops to 13°C. In the coldest period (1–3 months), the average temperature is about 5–10°C, with an average minimum on winter nights of 5–9°C, while in the hottest period (5–8 months) it is above 15–20°C, with an average diurnal maximum of 29–31°C. The mean relative humidity is 74%. Annual rainfall oscillates from a maximum in autumn (66.9 mm) to a minimum in summer (8.6 mm), with an annual average of 481.6 mm. Considerable differences exist between mountainous regions (up to 1,200 mm) and the arid south (less than 400 mm).

Holm oak (*Cyclamini-Quercetum ilicis*) grows everywhere on the island below 1000 m.a.s.l, but under the influence of man it has largely been replaced by pine (*Pinus halepensis*), which is now the dominant woodland tree, including all well-conserved beaches. In areas below 500–700 m.a.s.l., with annual precipitations of less than 600 mm, the wild olive tree predominates, while above 1000 m.a.s.l, the vegetation is low and adapted to strong winds. The extensive cultivated land consists principally of almond and olive trees, vineyards and cereals.

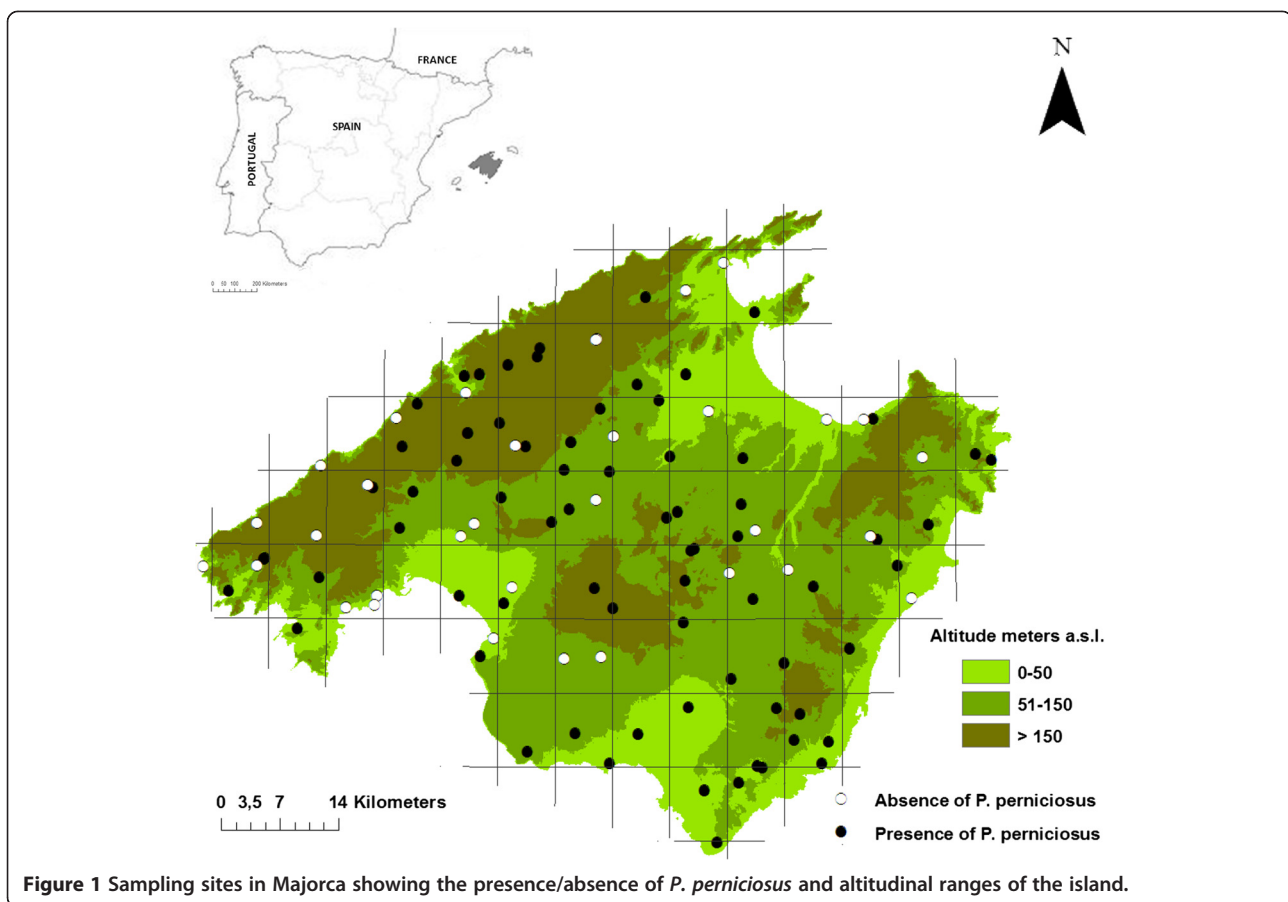
The island has two bioclimatic zones: meso-Mediterranean (T: average annual temperature 13–17°C; m: average minimum temperature of the coldest month –1 to –4°C; M: average maximum temperature of the coldest month 9 - 14°C; Ti: thermicity index 210–350), where oaks predominate (*Cyclamini-Quercetum ilicis*), and thermo-Mediterranean (T: 17–19°C; m: 4–10°C; M: 14 - 18°C; Ti: thermicity index from 350–470) with maquis (*Cneoro-Ceratonietum*) [16,17].

Capture of sand flies

In July 2008 sand fly captures were carried out in Majorca with sticky castor oil interception traps (20×20 cm) set for 4 days according to the standardized methodology implemented in the EDEN project (EU) [18-21]. The sampling sites consisted of holes used to drain embankments or containment walls, which were considered to be likely diurnal resting places for adult sand flies [22]. The capture stations were distributed in 77 grids (5×5 km²), almost one station per grid, covering the entire island. A total of 1,882 sticky traps were set, representing an adhesion surface of 150.56 m² distributed among 111 stations (Figure 1).

Data collection and environmental and meteorological variables

The characteristics of the stations, including location, habitat, environment and fauna, were recorded on a PDA



(Palm Tungsten T5) using Pendragon Form v.5.0 software (PSC, Libertyville, IL, USA) and GPS (Tom Tom Wireless GPS MK II). Maps were designed using ArcGIS 9.2 software (ESRI, Redlands, CA, USA).

Climate variables were provided by the Spanish Meteorological Agency (AEMet) from the 43 meteorological stations in the study area. Different periods were considered for the meteorological variables: i) Period 1 (Sampling Day 1, when traps were set, to Day 4, when traps were recovered) and ii) Period 2 (the month before Sampling Day 1). Climate data from the nearest meteorological station were assigned to each sampling site for periods 1 and 2 using the spatial join-and-relate tool of ArcGIS v.9.2 software and included: wind speed (Km/h), mean relative humidity (%), average rainfall (mm), and mean daily T (°C). The average minimum T (°C) in winter was also assigned.

Altitude data for each geocoded collection site were extracted from a 90 m resolution CGIAR Digital Elevation Model [23] using ArcGIS 9.2 software.

The presence of animals was studied in two ways: taking into account the animals or animal signs observed during captures, and using databases provided by the Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears (canine census

and livestock farms). In the latter, data from the closest station were assigned for each sampling site as described for the meteorological stations. A human census was obtained from municipal data.

Sand fly processing and identification

Sand flies were processed as previously described [1]. Briefly, sand flies were removed from the sticky traps with a brush and fixed in 96% ethanol and then in 70% alcohol until identification. Males and *Sergentomyia* spp. females were observed and identified under the stereo microscope. Females of the genus *Phlebotomus* were mounted on glass slides in Hoyer medium and identified on the basis of morphological characteristics in an optical microscope using the keys of Gállego [24].

Statistical analysis

For the study 57 variables were taken into account, including the habitat and environmental characteristics of the capture stations, fauna, demography and climate.

Bivariate logistic regression studies were conducted using the SPSS 20.0 software for Windows, with all the independent variables set against the presence/absence of *P. perniciosus* as the dependent variable. The majority

were used as categorical variables, except those related to meteorological conditions. Continuous variables such as the human and canine census were categorized in the search for association with the dependent variable. The possibility of interaction and/or confusion between different variables was examined by constructing and comparing different logistic regression models [19].

To construct the multivariate model, all the variables with $p < 0.2$ in the bivariate study were used. In the final multivariate model, variables with $p \leq 0.05$ were retained.

Results

88.2 % of the traps placed on the island of Majorca were recovered, representing a surface of 135.68 m². A total of 14,412 specimens were captured, with 4 species identified (Table 1): *Phlebotomus perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* and *Sergentomyia minuta*.

Among the mammophilic species, *P. perniciosus* was captured throughout the island in 77 of the 111 stations prospected, at 6 to 772 m.a.s.l. (Figure 1), with climate conditions during the capture period of 19.6-27.4°C, 55.5-86.4% relative humidity, 0–42 mm pluviometry and 3.1-17.1 km/h wind speed. *P. sergenti* and *P. papatasi* were captured in only 14 and 1 of the stations, respectively, and always in a low number. *P. ariasi* was not found anywhere on the island.

Bivariate analysis

The bivariate analysis of the factors associated with the presence of *P. perniciosus* gave results of $p < 0.2$ for 24 of the variables, which were taken into account in the multivariate analysis. 12 of these variables showed significant association ($p < 0.05$) with the sand fly presence in both bivariate and multivariate analyses (Table 2).

The probability of capturing *P. perniciosus* was significantly higher at 51 – 150 m.a.s.l. (O.R. = 3.13), at the edge of or between settlements (O.R. = 5.3), on a paved drive (O.R. = 2.90), in a wall drainage hole (not embankment) (O.R. = 2.11), in a general rural agricultural or forestry habitat (O.R. = 2.98), with adjacent flora of garrigue shrubs (O.R. = 14.53), in an agricultural area (O.R. = 5.52), and in the proximity of a sheep farm (O.R. = 2.72).

In contrast, the probability of capturing *P. perniciosus* showed a negative correlation with walls of bricks and mortar (O.R. = 0.26), non arable areas (O.R. = 0.27) and

the proximity of pigeon and bee farms (O.R. = 0.15 and 0.1, respectively) (Table 2).

Multivariate analysis

To construct the multivariate model, all the 24 variables with $p < 0.2$ in the bivariate study were used. The variables that make up the multivariate logistic regression model and are shown to be the best predictors of the presence/absence of *P. perniciosus* are: an altitude of 51–150 m.a.s.l. ($p = 0.01$, O.R. = 8.6), location of the sampling sites at the edge of or between villages ($p = 0.08$, O.R. = 8.08), a south east orientation ($p = 0.018$, O.R. = 34.97), the absence of drainage holes with plastic pipes ($p = 0.05$, O.R. = 3.45), adjacent flora of garrigue shrubs ($p = 0.001$, O.R. = 38.05) and the proximity of a sheep farm ($p = 0.001$, O.R. = 20) (Table 3).

Discussion

Four out of the five species previously reported for the island of Majorca (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* and *S. minuta*) [4,12-14,25] were captured. Although *P. ariasi* is cited [4,13,25], we were unable to capture this species despite sampling the whole island from 0 to 772 m.a.s.l and using a large number of traps. In Europe *P. ariasi* has been found at altitudes ranging from 10 m up to 2000 m.a.s.l. [20,26], showing a preference for sub-humid or humid areas with cold winters (supra-Mediterranean) [21,22,27], while Majorca has a semi-arid and sub-humid climate with mild summers (meso- and thermo-Mediterranean). The repeated reporting of *P. ariasi* in Majorca may stem from an erroneous citing, which has been duplicated in other publications. Nevertheless, in this study, although captures were made throughout the whole island, they were restricted to the month of July (2008). Therefore, in order to assess more accurately whether *P. ariasi* is present or absent from the island, captures need to be made at different periods of sand fly activity. Also, intensive studies using CDC light traps should be carried out over 700 m a.s.l. in the mountainous regions of the island, particularly the area of the Serra de Tramuntana.

Among the species found, only *P. perniciosus* is a vector of *L. infantum*, and is responsible for human and canine leishmaniosis in the Mediterranean region [28,29], while *P. sergenti* and *P. papatasi* are proven vectors of other

Table 1 Quantitative results of the sand fly fauna of Majorca. M: males, F: females

Species	Sex. ratio (M:F)	Abundance (%)	Density (n/m ²)	Frequency (%)
<i>P. perniciosus</i>	4:1	6.3	6.72	69.37
<i>P. sergenti</i>	24:1	0.2	0.18	12.61
<i>P. papatasi</i>	3:0	0.2 × 10 ⁻³	0.02	0.9
<i>S. minuta</i>	1.4:1	93.5	99.3	92.8

Table 2 Risk factors for the presence of *Phlebotomus perniciosus* in Majorca: Bivariate logistic regression model

	Number of stations (111)	Odds ratio (I.C. 95 %)	p - Value
Altitude (m.a.s.l.)			0.063
0-50	28	Ref.	
51-150	60	3.133 (1.195 – 8.214)	0.020
>150	23	1.625 (0.522 – 5.055)	0.402
Settlement			
Within settlement	21	Ref.	
Edge of/between settlements	90	5.339 (1.950 – 14.617)	0.001
Type of roadway			0.228
Paved public road	46	Ref.	
Paved drive	41	2.903 (1.100 – 7.658)	0.031
Unpaved track	9	2.463 (0.460 – 13.182)	0.292
Garden (in rural village and other settlement)	5	2.815 (0.291 – 27.206)	0.371
Property (farm and other)	10	1.056 (0.262 – 4.258)	0.939
Site category			0.421
Embankment drainage holes	19	Ref.	
Wall drainage holes (not embankment)	26	2.111 (0.204 – 0.843)	0.031
Other holes in walls (not embankment)	47	0.308 (0.062 – 1.522)	0.148
Natural rock crevices	3	0.235 (0.014 – 3.917)	0.313
Farm buildings (holes)	13	0.264 (0.040 – 1.735)	0.166
Sewer/drainage openings	3	-	0.999
Aspect			0.26
Other (all orientations except south-east and west facing)	73	Ref.	
South-east facing	15	2.990 (0.623 – 14.350)	0.171
West facing	23	0.716 (0.271 – 1.892)	0.500
Slope			0.843
None	79	Ref.	
Shallow (<10 %)	30	1.018 (0.407 – 2.546)	0.969
Steep (>10 %)	2	0.436 (0.026 – 7.270)	0.563
Shelter			0.776
Not sheltered	93	Ref.	
Sheltered	17	1.548 (0.465 – 5.149)	0.476
Unsure	1	-	1,000
Water course			
None	105	Ref.	
Natural	6	0.419 (0.080 – 2.191)	0.303
Wall construction			0.013
Stone without mortar	48	Ref.	
Stone/mortar	16	0.338 (0.101 – 1.133)	0.079
Brick/mortar	30	0.263 (0.097 – 0.714)	0.009
Other	17	1.974 (0.386 – 10.089)	0,414
Drain hole construction			
Plastic pipe	35	Ref.	
Other (unlined, cement pipe)	76	2.250 (0.964 – 5.249)	0.061

Table 2 Risk factors for the presence of *Phlebotomus perniciosus* in Majorca: Bivariate logistic regression model (Continued)

			0.961
Hole interior			
Bare	33	Ref.	
Dusty (bare)	68	0.784 (0.313 – 1.966)	0.604
Dusty (with vegetation)	3	0.750 (0.060 – 9.319)	0.823
Soil (with vegetation)	7	0.938 (0.153 – 5.728)	0.944
Vegetation on the wall			
No	86	Ref.	
Yes	25	1.529 (0.550 – 4.251)	0.416
General environment			0.02
Rural village	48	Ref.	
Rural agriculture and forestry	45	2.977 (1.095 – 8.091)	0.032
Coastal village	8	0.548 (0.122 – 2.475)	0.435
Other settlement (non rural or non coastal village)	10	0.366 (0.090 – 1.478)	0.158
General vegetation (100 m – 1Km)			0.178
Aleppo pine	51	Ref.	
Evergreen oaks	3	0.273 (0.023 – 3.219)	0.302
Garrigue shrubs	38	2.416 (0.888 – 6.575)	0.084
None	19	0.935 (0.313 – 2.795)	0.904
Adjacent flora			0.02
Aleppo pine and evergreen oaks	30	Ref.	
Garrigue shrubs	40	14.529 (2.949 – 71.587)	0.001
None	41	0.885 (0.343 – 2.284)	0.801
Land cover (Corine)			0.006
Urban area	33	Ref.	
Agricultural area	62	5.525 (2.113 – 14.448)	<0.001
Forest area	15	1.594 (0.462 – 5.497)	0.461
Humid area	1	-	1.000
Arable			0.107
Cereals	35	Ref.	
Root crop	2	0.167 (0.009 – 3.118)	0.231
Other (non cereal or root crop)	6	0.333 (0.048 – 2.328)	0.268
None	68	0.269 (0.093 – 0.781)	0.016
Garden			0.385
Grass, shrubs and trees	36	Ref.	
Paved hard surface	8	1.333 (0.276 – 6.442)	0.720
Orchard	56	2.187 (0.903 – 5.294)	0.083
None	11	-	0.999
Bioclimatic			
Meso-Mediterranean	63	Ref.	
Thermo-Mediterranean	48	1.130 (0.499 – 2.559)	0.770
Demographic data			
Humans			
≥ 688,5	106	Ref.	
≤ 688,4	5	0.276 (0.044-1.731)	0.169

Table 2 Risk factors for the presence of *Phlebotomus perniciosus* in Majorca: Bivariate logistic regression model (Continued)

Canine				
≤ 1989	56		Ref.	
≥ 1990	55		0.693 (0.308-1.561)	0.376
Animals seen**				
Dogs				
Yes	56		0.583 (0.258 – 1.321)	0.196
Cats				
Yes	9		1.600 (0.315 – 8.135)	0.571
Pet animals (dogs and cats)				
Yes	56		0.615 (0.272 – 1.391)	0.243
Equine				
Yes	7		2.789 (0.323 – 24.107)	0.351
Cattle				
Yes	2		0.434 (0.026 – 7.153)	0.560
Goat				
Yes	3		0.880 (0.077 – 10.047)	0.918
Sheep				
Yes	23		1.769 (0.597 – 5.242)	0.303
Pig				
Yes	1		-	1.000
Farm animals seen				
Yes	32		1.472 (0.582 – 3.721)	0.414
Rabbit				
Yes	2		-	0.999
Chicken				
Yes	13		2.667 (0.558 – 12.750)	0.219
Duck				
Yes	2		-	0.999
Pigeon				
Yes	5		0.649 (0.103 – 4.070)	0.644
Pen animals seen (Chicken, duck and pigeon)				
Yes	17		1.523 (0.458 – 3.066)	0.492
Livestock farms near***				
Horse				
Yes	44		0.540 (0.238 – 1.225)	0.140
Sheep				
Yes	58		2.720 (1.177 – 6.289)	0.019
Goat				
Yes	9		1.600 (0.315 – 8.135)	0.571
Pigs				
Yes	34		1.087 (0.450 – 2.624)	0.853
Rabbit				
Yes	7		0.304 (0.064 – 1.441)	0.134

Table 2 Risk factors for the presence of *Phlebotomus perniciosus* in Majorca: Bivariate logistic regression model (Continued)

Bovine			
Yes	4	0.427 (0.058 – 3.163)	0.405
Chicken			
Yes	23	0.786 (0.297 – 2.080)	0.628
Turkey			
Yes	4	0.136 (0.014 – 1.358)	0.089
Pigeon			
Yes	7	0.155 (0.028 – 0.842)	0.031
Pheasant			
Yes	1	-	1
Quail			
Yes	1	-	1
Partridge			
Yes	1	-	1
Bees			
Yes	5	0.099 (0.011 – 0.919)	0.042
Meteorological variables (continuous)*			
Wind period 1	3.1 – 17.1	0.937 (0.856 – 1.025)	0.157
Wind period 2	3.1 – 15	0.952 (0.854 – 1.062)	0.381
Humidity period 1	55.5 – 86.4	0.956 (0.907 – 1.008)	0.099
Humidity period 2	74.7 – 96.7	0.952 (0.881 – 1.028)	0.207
Rainfall period 1	0 – 42	0.954 (0.897 – 1.013)	0.126
Rainfall period 2	0 – 511	1.000 (0.996 -1.004)	0.936
Temperature period 1	19.6 – 27.5	0.911 (0.722 – 1.149)	0.432
Temperature period 2	19.8 – 26.2	0.974 (0.756 – 1.253)	0.835
Wintry temperature	-2.6 – 5.3	1.068 (0.857 – 1.331)	0.560

Dependent variable presence/absence of *P. perniciosus*. Ref. Reference category. C. I. = Confidence interval. Period 1: sampling day 1(traps set) today 4 (traps recovered). Period 2: the month before sampling day 1. *N is substituted by minimum and maximum values. **Reference category Animals seen: No. ***Reference category Livestock farms near: No.

Leishmania species in the Old World that are not present in Spain (*L. tropica* and *L. major*, respectively) [7,30-32].

The most common sand fly species in Majorca is *S. minuta*, followed by *P. perniciosus*, *P. sergenti* and *P. papatasi*. The capturing method may have influenced the abundance level of each species, since it is known that sticky traps favor the capture of *S. minuta* females, which could be due to the feeding habits of this herpetophilic species and its preferred resting sites [24,26]. Not enough *P. sergenti* and *P. papatasi* were captured for a statistical analysis of the factors affecting their presence in Majorca. As mentioned previously, most of the island is below 200 m.a.s.l., with a semi-arid climate, which are ideal conditions for *P. sergenti* to occur [33-35], yet this species was found at a low frequency (12.6 %). In other areas of Spain [35], *P. sergenti* has been found at altitudes of 0–1,153 m.a.s.l. and in the same type of meso- and

thermo-Mediterranean bioclimates as in Majorca. Perhaps the location of traps within urbanized settlements (21 stations) or at the edge of/between settlements (90 stations), with little or no presence of humans, influenced the results, since *P. sergenti* is a peridomestic and anthropophilic species found in rural villages [30] and rare in intensely urban areas [36]. The other scarcely sampled species, *P. papatasi*, prefers peri-arid and Saharan environments [33], not present in Majorca.

P. perniciosus was captured in Majorca from 6 to 772 m a.s.l., the maximum altitude at which the sticky traps were placed, since above that there was a lack of appropriate locations for setting traps. In Europe, the species occupies sites from sea level to 1534 m a.s.l. [19,20,26]. The probability of finding *P. perniciosus* was significantly higher at altitudes of 51 – 150 m.a.s.l., both in the bivariate and multivariate analysis. Stations

Table 3 Risk factors for the presence of *Phlebotomus perniciosus* in Majorca: Multivariate logistic regression model

	Odds ratio (I.C. 95 %)	p - Value
Altitude (m.a.s.l.)		0.019
0-50	Ref.	
51-150	8.653 (1.514 – 49.441)	0.015
>150	0.805 (0.131 – 4.964)	0.816
Settlement		
Within settlement	Ref.	
Edge of/between settlement	8.080 (1.737 – 37.596)	0.008
Aspect		0.03
Other (all orientations except south-east and west facing)	Ref.	
South-east-facing	34.975 (1.817 – 673.425)	0.018
West-facing	0.457 (0.116 – 1.798)	0.263
Drainage hole construction		
Plastic pipe	Ref.	
Other (unlined, cement pipe)	3.451 (1.002 – 11.880)	0.050
Adjacent flora		0.001
Aleppo pine and evergreen oaks	Ref.	
Garrigue shrubs	38.051 (4.900 – 295.469)	0.001
None	1.308 (0.323 – 5.307)	0.707
Sheep farm near		
No	Ref.	
Yes	19.989 (3.557 – 112.322)	0.001

Dependent variable presence/absence of *P. perniciosus*. Ref. Reference category. C. I. = Confidence interval. $R^2 = 0.571$.

at 0 – 50 m.a.s.l. were located in breezy coastal areas and sand flies are very sensitive to windy conditions [26,29,30]. In locations at 51 – 150 m.a.s.l. the adjacent flora consisted principally of garrigue shrubs, where the probability of finding *P. perniciosus* is significantly higher.

Locations between or at the edge of settlements favored the presence of *P. perniciosus* compared to those within settlements, as found in other studies [1,18,19,21], which would indicate that urban environments are not suitable for *P. perniciosus*. The barbicans and other locations where sticky traps were placed constituted resting sites, which are often near the larval breeding sites [22,26,29]. In agreement with the site location, a positive correlation was obtained with a rural agricultural and forestry environment, where the probability of finding *P. perniciosus* was 3 times higher than in a rural village, as well as with an area of agricultural land cover, where the probability was more than 5 times higher than in urbanized areas. These results also match the negative correlation found in non-arable points of capture, usually in rural and/or urbanized areas, where the probability of capturing *P. perniciosus* decreased in comparison with stations near arable areas (cereals). In non-urbanized areas the terrestrial cycle

of immature forms would be favored, and the females would have more access to suitable oviposition sites [18,21]. In addition, the deployment of insecticides in urbanized areas during the summer period when blood-sucking insects are active would reduce the population of sand flies in those settlements, and it is considered a way of controlling leishmaniasis [37].

The presence of animals near the sampling site increased the probability of encountering *P. perniciosus*, for several reasons: i) the presence of animal excrements would constitute a good sand fly breeding substrate; ii) sand flies have a poor capacity for flying and dispersing far from their breeding sites (usually 300 m and rarely more than 1 km) [26,29,30], which may explain the existence of small localized populations [38]; and iii) *P. perniciosus* exhibits opportunistic feeding behavior [39-42]. Nevertheless, in contrast with previous studies [1,18,19], no correlation was found with the presence of animals or animal traces such as feces near the trapping sites, only with an abundance of animals in livestock farms. Not all livestock species attract *P. perniciosus* in the same way [19], and its capture increased significantly when sheep farms were near to the sampling site. Notably, sheep farms contain a greater number of animals that remain

outside overnight, when sand flies are active. No demographic influence of humans or dogs was found, probably because the stations with the highest presence of *P. perniciosus* were located between villages, away from urban settlements.

Some other variables correlated with the presence of *P. perniciosus* only in the bivariate analysis, such as the type of road, site category, land cover, wall construction and arable area, while the type of drainage hole correlated only in the multivariate analysis. The probability of capturing *P. perniciosus* in a paved drive was 2.9 times higher than in a paved public road, where greater car traffic would disturb sand flies. Drainage holes in non-embankment walls favored the presence of *P. perniciosus* in contrast with those in embankments, probably because the former have no air currents. On the contrary, the presence of *P. perniciosus* decreased by 75% in stone or brick walls with mortar, probably because these have fewer suitable resting places than walls without mortar. As described elsewhere, the use of PVC in drainage holes decreased the probability of finding *P. perniciosus* and could be considered as a control method to reduce leishmaniosis transmission [19].

The influence of climate variables on the distribution and activity of sand flies has been repeatedly reported [26,30,31,43]. In contrast with other reports [18,19,21,41], in the current study in Majorca, climate variables did not affect the probability of finding *P. perniciosus*, probably due to the short period of time when captures were performed (July 2008) and the homogenous geographical conditions of most trapping sites. It should also be taken into account that the island of Majorca has a Mediterranean climate, which remains highly stable over long periods, with the exception of the mountainous areas, and captures were not made over 700 m.a.s.l., due to the absence of appropriate places to set traps. More studies involving periodic captures throughout the summer, or over one year are required, as has been done in another Balearic island (Minorca) [1], to obtain more data on the influence of climate conditions on sand fly distribution.

The presence of *P. perniciosus* in Majorca is a health issue since it is a vector of *L. infantum* in the Mediterranean area. Leishmaniosis poses a risk not only for the habitual inhabitants of the island, but also for the large numbers of tourists visiting in the summer, coinciding with the period of vector activity. In addition, these tourists often travel with their pets, which are at risk of developing CanL. In central and northern European countries cases of leishmaniosis have repeatedly been reported in humans and dogs that have visited endemic areas [43-45]. Recent accounts of sand flies with a proven or suspected capacity to transmit *L. infantum* in non-endemic areas [46,47], together with the arrival of infected persons and animals, would favor the possibility of autochthonous

transmission in new areas, as has been reported in the island of Minorca [1].

Conclusion

The sand fly fauna in Majorca is composed of four species: *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* and *S. minuta*. The distribution of *P. perniciosus* extends throughout the island, from sea level to the mountains, being present in 70 % of the capture sites. This suggests that a risk of leishmaniosis transmission exists all over the island, and the presence of tourists during the period of *P. perniciosus* activity could favor the dispersion of the disease to other countries. The probability of finding *P. perniciosus* was higher at altitudes ranging from 51 to 150 m.a.s.l., with adjacent garrigue shrub vegetation, at the edge of or between settlements, and in proximity to a sheep farm.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. The contents are the sole responsibility of the authors.

Authors' contributions

MGC, MPV, MMAA designed and supervised the study. MGC, CBF, TSF, SCG, MMAA undertook field and laboratory activities. MGC, JMS, MMAA analyzed the data and carried out the statistical analysis, MGC, MPV, JMS, MMAA drafted and revised the manuscript. All the authors revised and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain (CGL2007-66943-C02-01/BOS), Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (Spain) (2009SGR385). The Spanish Meteorological Agency (AEMet) provided the meteorological data for the study. Thanks to Anna Lanau for her assistance in placing traps and collecting sand flies. We are also grateful for the help of the Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears, especially R. García and A. Figueroa. MMA was awarded a contract in the Spanish project.

Author details

¹Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona (Spain), Barcelona, Spain. ²Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB), UB-Fundació Clínic, Barcelona, Spain. ³Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, Spain. ⁴Grup d'Estudi de les Malalties Emergents, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut, IUNICS, Mallorca, Spain.

Received: 2 July 2014 Accepted: 24 August 2014

Published: 4 September 2014

References

- Alcover MM, Ballart C, Serra T, Castells X, Scalone A, Castillejo S, Riera C, Tebar S, Gramiccia M, Portús M, Gállego M: **Temporal trends in canine leishmaniosis in the Balearic Islands (Spain): A veterinary questionnaire. Prospective canine leishmaniosis survey and entomological studies conducted on the Island of Minorca, 20 years after first data were obtained.** *Acta Trop* 2013, **128**:642-651.
- Pittaluga G: *Etude épidémiologique sur la "Leishmaniose viscérale" en Espagne. Rapport présentée à l'Organisation d'Hygiène de la Société des Nations (8 octobre 1925).* Genève: Société des Nations 1700 (P) 10/25; 1925:1700.
- Matas-Mir B, Rovira-Alos J: *Estudio epidemiológico de la leishmaniosis canina en la isla de Mallorca.* Palma de Mallorca: Conselleria de Sanitat i Seguretat Social del Govern Balear; 1989.

4. Amela C, Suarez B, Isidoro B, Sierra MJ, Santos S, Simón F: *Evaluación del riesgo de transmisión de Leishmania infantum en España*. Madrid: Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES), Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2012.
5. Xarxa de Vigilància Epidemiològica de les Illes Balears: *Informe 2012*. Palma de Mallorca: Conselleria de Salut, Direcció General de Salut Pública i Consum, Govern de les Illes Balears; 2013.
6. Fulls setmanals de Vigilància Epidemiològica: *Fulls setmanals de Vigilància Epidemiològica*. Palma de Mallorca: Servei d'Epidemiologia, Direcció General de Salut Pública i Consum, Conselleria de Salut del Govern Balear; 2002. April 2014.
7. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, and the WHO Leishmaniasis Control Team: **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence**. *PLoS One* 2012, **7**:e35671.
8. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez MT, Muncunill J, Sedeño M, Mascaró M, Udina M, Gállego M, Carrió J, Forteza A, Portús M: **Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain)**. *Transfusion* 2008, **48**:1383–1389.
9. Alvar J: *Las Leishmaniasis: de la Biología al Control*. Salamanca: Laboratorios Intervet S.A.; 2001.
10. Seguí MG: **Estudi epidemiològic de la leishmaniasis a l'illa de Menorca**. *Revista de Menorca* 1991, **2**:153–178.
11. Pujol A, Cortés E, Ranz A, Vela C, Aguiló C, Martí B: **Estudi de seroprevalència de leishmaniosi i d'ehrlichiosi a l'illa de Mallorca**. *Revista del Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears Veterinària* 2007, **32**:9–12.
12. Gil Collado J: **Phlébotomes et leishmanioses en Espagne**. In *Écologie des Leishmanioses, Montpellier 1974. Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique N. 239*. Paris: Centre National de la Recherche Scientifique; 1977:177–189.
13. Gil-Collado J, Morillas-Márquez F, Sanchís-Marin MC: **Los flebotomos en España**. *Rev San Hig Pub* 1989, **63**:15–34.
14. Lladó MT, Rotger MJ: *Estudio del flebotomo como vector de la leishmaniasis en la isla de Mallorca*. Palma de Mallorca: Conselleria de Sanitat i Seguretat Social del Govern Balear; 1990.
15. Molina R, Aransay A, Nieto J, Cañanvate C, Chicharro C, Sans A, Flores M, Cruz I, García E, Cuadrado J, Alvar J: **The Phlebotomine sand flies of Ibiza and Formentera Islands (Spain)**. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2005, **82**:12–13.
16. de Bolós i Capdevila O: *La vegetació de les Illes Balears. Comunitat de plantes*. 2nd edition. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans; 1997.
17. Rivas-Martínez S: *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. I.C.O.N.A.; 1987.
18. Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, Martín O, Dos Santos-Brandao F, Guerrero I, Cubero E, Molina R: **Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniasis sand fly vector abundances in Central Spain**. *Acta Trop* 2010, **115**:95–102.
19. Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Irigaray C, Martín-Sánchez J: **Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease**. *Parasitology* 2011, **138**:1234–1244.
20. Ballart C, Barón S, Alcover MM, Portús M, Gállego M: **Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi***. *Acta Trop* 2012, **122**:155–159.
21. Ballart C, Guerrero I, Castells X, Barón S, Castillejo S, Alcover MM, Portús M, Gállego M: **Importance of individual analysis of environmental and climatic factors affecting the density of *Leishmania* vectors living in the same geographical area: the example of *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus* in Northeast Spain**. *Geospat Health* 2014, **8**:367–381.
22. Rioux JA, Carron S, Dereure J, Périères J, Zeraia L, Franquet E, Babinot M, Gállego M, Prudhomme J: **Ecology of leishmaniasis in the South of France**. **22. Reliability and representativeness of 12 *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) sampling stations in Vallespir (eastern French Pyrenees region)**. *Parasite* 2013, **20**:34.
23. Jarvis A, Reuter HI, Nelson A, Guevara E: *Hole – filled seamless SRTM data V4*. International Centre for Tropical Agriculture (CIAT); 2008. <http://srtm.csi.cgiar.org/>.
24. Gállego J, Botet J, Gállego M, Portús M: **Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación corológica. Comentarios sobre los métodos de captura**. In *Memoria al Prof. Dr. D. F. de P. Martínez Gómez*. Edited by Hernández S. Córdoba: Publicaciones de la Universidad de Córdoba; 1992:581–600.
25. Lucientes J, Castillo JA, Gracia MJ, Peribáñez MA: **Flebotomos, de la biología al control**. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* 2005, **6**:1–8.
26. Rioux JA, Golvan YJ: *Épidémiologie des Leishmanioses dans le Sud de la France*. Paris: Monographies de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. N° 37; 1969.
27. Aransay AM, Testa JM, Morillas-Marquez F, Lucientes J, Ready PD: **Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain**. *Parasitol Res* 2004, **94**:416–420.
28. Gállego M: **Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis**. *Rev Sci Tech* 2004, **23**:661–676.
29. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L: **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern**. *Med Vet Entomol* 2013, **27**:123–147.
30. Killick-Kendrick R: **The biology and control of Phlebotomine sand flies**. *Clin Dermatol* 1999, **17**:279–289.
31. Ready PD: **Leishmaniasis emergence in Europe**. *Euro Surveill* 2010, **15**:19505.
32. WHO: **Control of the leishmaniasis: Report of a WHO expert committee**. *WHO Tech Rep Ser* 2010, **949**:1–186 [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf]
33. Rioux JA, Rispaill P, Lanotte G, Lepart J: **Relation Phlébotomes-bioclimats en écologie des leishmanioses. Corollaires épidémiologiques. L'exemple du Maroc**. *Bulletin de la Société botanique de France* 1984, **131**:549–557.
34. Gállego M, Rioux JA, Rispaill P, Guilvard E, Gállego J, Portús M, Delalbre A, Bastien P, Martínez-Ortega E, Fisa R: **Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña)**. *Rev Iber Parasitol* 1990, **50**:123–127.
35. Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Gállego M, Molina R, Martín-Sánchez J: **Predicting the risk of an endemic focus of *Leishmania tropica* becoming established in south-western Europe through the presence of its main vector, *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917**. *Parasitology* 2013, **140**:1413–1421.
36. Boussaa S, Neffa M, Pesson B, Boumezzough A: **Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of southern Morocco: results of entomological surveys along the Marrakech- Ouarzazat and Marrakech-Azilal roads**. *Ann Trop Med Parasitol* 2010, **104**:163–170.
37. Alexander B, Maroli M: **Control of phlebotomine sandflies**. *Med Vet Entomol* 2003, **17**:1–18.
38. Belen A, Alten B, Aytekin AM: **Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Phlebotomus papatasi* populations**. *Med Vet Entomol* 2004, **18**:343–350.
39. de Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Wolff M, Seguí G: **Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method**. *J Med Entomol* 1995, **32**:229–233.
40. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M: **Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy**. *Acta Trop* 2008, **105**:158–165.
41. Branco S, Alves-Pires C, Maia C, Cortes S, Cristóvão JMS, Gonçalves L, Campino L, Afonso MO: **Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal**. *Acta Trop* 2013, **125**:339–348.
42. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R: **Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?** *Vet Parasitol* 2014, **202**:296–300.
43. Aspöck H, Gerersdorfer T, Formayer H, Walochnik J: **Sand flies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change**. *Wien Klin Wochenschr* 2008, **120**:24–29.
44. Poepl W, Herkner H, Tobudic S, Faas A, Auer H, Mooseder G, Burgmann H, Walochnik J: **Seroprevalence and asymptomatic carriage of *Leishmania* spp. in Austria, a non-endemic European country**. *Clin Microbiol Infect* 2013, **19**:572–577.
45. Rioux JA, Houin H, Ranque J, Lapiere J: *Écologie des Leishmanioses. Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique, 1974*. Paris: Centre National de la Recherche Scientifique; 1977:190. N. 239.

46. Haeberlein S, Fischer D, Thomas SM, Schleicher U, Beierkuhnlein C, Bogdan C: **First Assessment for the Presence of Phlebotomine Vectors in Bavaria, Southern Germany, by Combined Distribution Modeling and Field Surveys.** *PLoS One* 2013, **8**:e81088.
47. Poepl W, Obwaller AG, Weiler M, Burgmann H, Mooseder G, Lorentz S, Rauchenwald F, Aspöck H, Walochnik J, Naucke TJ: **Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country.** *Parasitol Res* 2013, **112**:4231–4237.

doi:10.1186/1756-3305-7-421

Cite this article as: Alcover *et al.*: Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors* 2014 7:421.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



V.- DISCUSIÓN

“Si quieres ser sabio,
aprende a interrogar razonablemente,
a escuchar con atención, a responder serenamente
y a callar cuando no tengas nada que decir”

Johann Kaspar Lavater

V.- DISCUSIÓN

En los países de la cuenca Mediterránea occidental europea la leishmaniosis se comporta como una enfermedad hipoendémica (Quinnell y Courtenay, 2009). El perro actúa como principal reservorio de la enfermedad y el hombre como víctima accidental (Quinnell y Courtenay, 2009). *Leishmania infantum* es la única especie responsable tanto de la leishmaniosis humana como de la leishmaniosis canina en esta zona (Abranches y col., 1986; Alvar y Ortiz, 1987; Gramiccia y col., 1986; Morillas y col., 1996; Portús y col., 1986; 2007; Moreno y col., 1986; Rioux y col., 1980).

El cálculo de la intensidad de transmisión de la leishmaniosis en un foco se basa en el estudio de distintos indicadores usados con fines epidemiológicos, como pueden ser la prevalencia de parasitación del hospedador vertebrado (intradermoreacción, seroprevalencia, frecuencia del aislamiento del parásito) (Acardi y col., 2010; Ballart y col., 2013; Dereure y col., 2009; Fisa y col., 1999; Gálvez y col., 2010b; Morillas-Márquez y col., 2002), o la prevalencia de la infección por *Leishmania* en los flebotomos (disección, detección de ADN del parásito) (Acardi y col., 2010; Guilvard y col., 1996; Jiménez y col., 2013; Martín-Sánchez y col., 2006; Rioux y col., 1986; Rossi y col., 2008).

En los últimos años, la leishmaniosis ha sufrido un incremento en su prevalencia en áreas clásicamente consideradas endémicas (Gálvez y col., 2010b; Martín-Sánchez y col., 2009) y se ha detectado la aparición de casos en zonas consideradas indemnes (Ballart y col., 2013; Miró y col., 2012; Morosetti y col., 2009). Estas variaciones pueden ser debidas a diferentes factores, entre los que se encuentran los cambios medioambientales, como el calentamiento del globo terráqueo (Aspöck y col., 2008; Dufour y col., 2008; Githeko y col., 2000; Maroli y col., 2013; Peterson y Shaw, 2003), o a cambios en el funcionamiento de los focos, con la aparición de nuevos reservorios, como es el caso descrito por Molina y col. (2012b) en Fuenlabrada (Madrid). El movimiento de personas y animales de un área no endémica a otra endémica también ha originado la detección de casos en nuevas áreas geográficas (Menn y col., 2010; Poepl y col., 2012).

La lucha contra la leishmaniosis necesita de una visión integral del problema: detección y control de vectores y reservorios, vigilancia pasiva y activa con registro de casos,

desarrollo de métodos diagnósticos que permitan la detección de los enfermos, educación sanitaria (Alvar y col., 2004; 2012; Maroli y col., 2013; WHO, 2012). Esta visión holística del problema requiere de la participación de especialidades distintas (parasitología, biología, epidemiología, entomología, medicina, veterinaria, ...), además de estructuras hospitalarias, centros de salud y laboratorios adecuados, personal bien entrenado y recursos económicos suficientes. En los países más desarrollados donde hay leishmaniosis ésta aparece de forma poco prevalente, por lo que no es prioridad para las autoridades sanitarias, y en aquellos países donde es un problema grave de salud no existen los recursos necesarios para abordar el problema (Alvar y col., 2004; Bern y col., 2010; Picado y col., 2012; Romero y Boelaert, 2010; WHO, 2012).

Como ya se ha mencionado, la detección de los verdaderos vectores es esencial. Son pocos los estudios en los que se analiza **la capacidad vectorial de los flebotomos**, bien sea mediante técnicas clásicas de disección (Azizi y col., 2008; Carvalho y col., 2008; Guilvard y col., 1996; Lucientes y col., 1988; Pires, 1984; Rioux y col., 1986) como mediante una técnica molecular (Acardi y col., 2010; Azizi y col., 2008; Carvalho y col., 2008; Gramiccia y col., 2010; Jiménez y col., 2013; Maia y col., 2009; Martín-Sánchez y col., 2006; Morosetti y col., 2009; Tiwary y col., 2013). En el estudio descrito en el **capítulo 1**, hemos aplicado una **n-PCR al estudio de la infección natural de los flebotomos por *L. infantum*** además de analizar la **utilidad del grado de digestión de la sangre** en el estudio epidemiológico.

Los resultados muestran que la prevalencia varía, de una localidad a otra, de acuerdo con el grado de endemicidad de la leishmaniosis humana y se correlaciona con la prevalencia de la leishmaniosis canina en estos enclaves. Además, se constata una discordancia en los datos de la prevalencia de parasitación obtenidos mediante el método clásico de disección y los métodos moleculares. Pero, mientras la prevalencia en la detección de ADN incrementa de forma considerable cuando la PCR se aplica a los flebotomos de forma individualizada, tal como ha ocurrido en nuestro estudio en Torroja en comparación con los estudios de Guilvard y col. (1996), no se observan estas diferencias al aplicar los métodos moleculares a lotes de flebotomos, tal y como ha ocurrido en Sant Just y Torroja en un estudio previo (Martín-Sánchez y col., 2006).

Dichas diferencias en la prevalencia del parasitismo de los flebotomos pueden ser debidas también a la distinta sensibilidad de las técnicas. Así, en nuestro estudio, la n-PCR, realizada sobre especímenes aislados, presenta una sensibilidad de 5×10^{-4}

promastigotes (Rossi y col., 2007), mientras que la técnica ELISA-PCR utilizada por Martín-Sánchez y col. (2006) tiene una sensibilidad de 0,1 promastigotes, que en presencia de una concentración elevada de ADN del hospedador en los lotes de flebotomos se reduce a 3 parásitos.

La baja sensibilidad en la detección de la infestación de los flebotomos por *Leishmania* mediante la técnica de disección, en contraposición con la elevada sensibilidad de las técnicas de biología molecular, ha sido puesta de manifiesto por diferentes autores. Así, Rossi y col., en el 2007, encuentran una prevalencia de 1,4% y de 47,2%, respectivamente, en un estudio realizado con *P. perniciosus* procedentes de la provincia de Roma en Italia. Por otro lado, la metodología de la PCR aplicada (extracción, cebadores, etc.) también influye en la capacidad de detectar el parasitismo, tal y como se ha citado en la detección de ADN de *Leishmania* de una misma muestra para el estudio de la leishmaniosis canina por Lachaud y col. (2002).

Sin embargo, la detección de ADN de *Leishmania* en los flebotomos no indica que éstos sean vectores e infestantes (Aransay y col., 2000; Rossi y col., 2007), ya que puede estar relacionada no sólo con la presencia de promastigotes vivos sino también con la presencia de fragmentos de ADN de amastigotes de *Leishmania*. En el último caso, podría tratarse de infestaciones iniciales que no llegaron a cumplir todo el ciclo biológico, hasta encontrarse las formas metacíclicas en el aparato bucal del díptero para ser introducidas a un hospedador vertebrado durante la ingesta de sangre. Así, el hallazgo en nuestro estudio de ADN de *Leishmania* en *P. sergenti*, sólo indicaría que ha ingerido sangre de una persona o animal parasitado, pero no que sea un vector de *Leishmania infantum* en la zona.

Distintos autores abordan el importante papel que pueden tener las poblaciones autóctonas de flebotomos en la expansión de la leishmaniosis en el mediterráneo de cepas autóctonas (Dujardin y col., 2008; Ready y col., 2010) e incluso de especies consideradas como exóticas (*L. donovani* en Chipre y un nuevo zimodema de *L. tropica* en Creta) (Antoniou y col., 2013). Últimamente existen muchos estudios buscando la implicación de vectores alternativos de la leishmaniosis (Campino y col., 2013; Coelho y Bresciani, 2013; Dantas-Torres, 2011; de Moraes y col., 2013; Dougall y col., 2011; Nzelu y col., 2014; Slama y col., 2014; Trotta y col., 2012). Sin embargo, el ciclo de vida de las leishmanias en el vector incluye varias formas morfológicas y una serie compleja de interacciones que en muchos casos son específicas (Dostálova y Volf,

2012), lo que hace que tan sólo algunas especies de artrópodos, véase de flebotomos, puedan ejercer dicho papel vectorial. Seblova y col. (2014), advierten del peligro de incriminar a los vectores exclusivamente por métodos moleculares, especialmente cuando dichas investigaciones son llevadas a cabo por laboratorios y/o investigadores con poca o nula experiencia en el estudio del ciclo de las leishmanias y de sus vectores.

Es por ello que, en nuestro estudio, analizamos el grado de digestión de la sangre ingerida por los flebotomos. Cabría pensar que cuanto mayor sea dicho grado de digestión mayor será la posibilidad de que el ADN detectado provenga de formas metacíclicas tras haberse producido el ciclo metagenético del parásito. En los flebotomos con un grado de digestión bajo la posibilidad de que el ADN detectado sea de formas recientemente ingeridas, no infectivas, sería elevada. Este sería el caso mencionado de *P. sergenti*.

Los resultados obtenidos muestran que la técnica de PCR aplicada en flebotomos capturados en Cataluña (**ver capítulo 1**) se podría utilizar para el estudio epidemiológico de la leishmaniosis en las Islas Baleares. La PCR permitiría detectar en que zonas de las Baleares se detecta ADN de *Leishmania* en los flebotomos, pero después sería necesario confirmar dicho papel vectorial y realizar disecciones de los flebotomos. Ello podría ser especialmente útil en la isla de Menorca para detectar si existe transmisión vectorial de la leishmaniosis, emergente en la isla (ver capítulo 2).

Por otro lado, el estudio de la ingesta sanguínea es también de importancia dado que, como han puesto en evidencia algunos autores, la presencia de unos u otros animales, mamíferos y aves principalmente, que representan la fuente de alimentación de los flebotomos, puede afectar de forma diferente la presencia y el mantenimiento de las poblaciones de los flebotomos y el ciclo intravectorial de las leishmanias. Un claro ejemplo sería el poder atractivo de las gallinas por parte de *L. longipalpis* en Brasil, vector de *L. infantum* (Alexander y col., 2002). Ello favorecería la presencia de dicho vector pero, al mismo tiempo, haría disminuir la tasa de picadas al humano o al reservorio canino. Además, se ha observado que las leishmanias no se desarrollan bien en las aves y que los flebotomos infestados en anteriores ingestas eliminarían los parásitos si se alimentaran en una segunda ingesta sanguínea de las gallinas (Alexander y col., 2002).

Los estudios realizados en Menorca y Mallorca, entomológicos y serológicos en el primer caso (ver capítulo 2) y entomológicos en el segundo caso (ver capítulo 3),

podrían ser completados aplicando esta técnica de n-PCR a los flebotomos de la zona. Se obtendrían datos preliminares de la transmisión vectorial de un foco del que disponemos de datos parciales o de estudios previos que indicaban la ausencia de la leishmaniosis en la zona (Portús y col., 1994; Seguí y col., 1989; Seguí, 1991a; b; c). Si detectáramos ADN en el intestino de los flebotomos, los resultados positivos nos ofrecerían datos sobre el riesgo de la distribución de la enfermedad y grado de endemidad en la isla de Mallorca y, en Menorca, nos confirmaría la instauración de un nuevo foco de transmisión vectorial. Estos estudios tendrían que completarse con la disección de los flebotomos para la observación del parasitismo.

Ya se ha mencionado que la existencia de leishmaniosis en un área depende de la presencia de los vectores y, en el caso de la producida por *L. infantum*, también del hospedador vertebrado principal, en este caso el perro. Así, los estudios para analizar el riesgo de la leishmaniosis tienen que abarcar tanto aspectos entomológicos como de la presencia del reservorio y de leishmaniosis canina.

Una forma fácil, de bajo coste y relativamente rápida de abordar la presencia de la leishmaniosis canina y de ver cómo ha evolucionado a lo largo del tiempo en las Islas Baleares es mediante la utilización **de cuestionarios enviados a los clínicos veterinarios**. Esta metodología ya ha sido aplicada en otras regiones geográficas de Europa (Bourdeau y col., 2014; Farkas y col., 2011; Geisweid y col., 2012; Morosetti y col., 2009; Sifaki-Pistola y col., 2014), incluyendo diversos puntos de España: Madrid (Gálvez y col., 2011), Lleida (Ballart y col., 2013) y región levantina (Ruiz de Ybáñez y col., 2009). Para el presente estudio se mandaron unos **cuestionarios estándar, a los veterinarios de las Islas Baleares**, elaborados y aplicados en el proyecto EDEN (anexo 8) (**ver capítulo 2**).

Se enviaron 111 cuestionarios a la totalidad de clínicas veterinarias de pequeños animales (datos obtenidos gracias a la colaboración *del Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears*), obteniendo una participación del 38%. Dicha participación es moderada comparándola con la obtenida por otros equipos, que oscila entre el 23% y el 83,3% (Ballart y col., 2013; Farkas y col., 2011; Gálvez y col., 2011; Morosetti y col., 2009; Ruiz de Ybáñez y col., 2009). Sin embargo, los resultados obtenidos aportaron datos muy interesantes, ya que los veterinarios de Menorca, aunque pocos (n=6, 22%), respondieron que observaban casos de leishmaniosis canina en la isla, que dichos casos estaban en aumento y que consideraban eran autóctonos. Estudios previos realizados en

Menorca (Portús y col., 1994; Seguí, 1991a; b; c), mencionaban la presencia de casos esporádicos de leishmaniosis canina en la isla, pero siempre en perros procedentes de áreas endémicas.

Dado los datos previos y los resultados obtenidos de las encuestas veterinarias, se decidió llevar a cabo **un estudio prospectivo de la leishmaniosis canina en Menorca (ver capítulo 2)**. Para ello, se solicitó la colaboración de los veterinarios que habían respondido a la encuesta y se decidió obtener muestras de suero de una cincuentena de animales de cada una de las tres clínicas que aceptaron participar, ubicadas de manera estratégica en tres puntos de la isla (este, centro y oeste) (anexo 9), para facilitarnos una visión global del estado de la leishmaniosis canina. Los perros que entraban en el estudio debían ser escogidos al azar, pero el resultado de seroprevalencia obtenido, del 24%, es elevado si lo comparamos con otros valores descritos en España que oscilan entre el 0% y el 34,6% (Aisa y col., 1998; Ballart y col., 2013; Fisa y col., 1999; Gálvez y col., 2010b; Miró y col., 2012; Morales-Yuste y col., 2012; Morillas y col., 1996). Ello nos hizo sospechar que algunos de los perros introducidos en el estudio habían sido seleccionados por presentar sintomatología compatible con la leishmaniosis, por lo que los resultados obtenidos no son un reflejo fiel de la seroprevalencia de la enfermedad en la isla. Sin embargo, de dicho estudio es de destacar que los perros analizados que habían nacido en la isla y nunca habían salido de ella presentaban una seroprevalencia del 31%, lo que permite sospechar la emergencia de un foco de leishmaniosis canina autóctono en la isla de Menorca.

La introducción de animales infestados en un área es uno de los factores de riesgo para que se instaure la leishmaniosis canina en un área considerada no endémica (Aspöck y col., 2008; Ferroglio y col., 2005; Hamel y col., 2013; Poepl y col., 2013; Ready, 2010; Slappendel y Teske, 1999). Así se constata en el estudios de Maroli y col. (2008), y este aspecto ya fue considerado por Seguí (1991a; b; c), quien recomendaba controlar a los perros que procedían de zona endémica y entraban en Menorca. No hay que olvidar que tanto las Islas Pitiusas como Mallorca están muy cercanas a la isla de Menorca y que entre ellas hay muchos desplazamientos. En dichas islas se presenta una elevada endemicidad de la leishmaniosis, tanto canina (Abellán García, 1997; Chicharro y col., 2004; Matas y Rovira, 1989; Nieto y col., 2003) como humana (Riera y col., 2004 y 2008; Xarxa de Vigilància Epidemiològica de les Illes Balears, 2013; Fulls setmanals de Vigilància Epidemiològica, 2002 – 2014). El riesgo de adquisición de una

leishmaniosis debido al desplazamiento de personas y animales de zonas no endémicas a las endémicas ha sido mencionado (Antinori y col., 2005; Äspöck y col., 2008; Bart y col., 2013; Hamel y col., 2013; Mencke, 2011; Moore y Brown, 2013; Neghina y col., 2009; Teske y col., 2002) y el archipiélago balear es uno de los lugares turísticos más apreciados, llegando muchos de los turistas y sus mascotas durante la época estival en que los flebotomos están activos.

Otro mecanismo para la emergencia de la leishmaniosis podría producirse por la llegada de flebotomos parasitados, aunque esta forma sería más difícil en la isla de Menorca, ya que los flebotomos tendrían que llegar volando de las otras islas Baleares, o de la Península, y estos dípteros son malos voladores (Killick-Kendrick, 1999; Léger y Depaquit, 1999). No puede descartarse la llegada de flebotomos parasitados en aviones, como se ha mencionado por ejemplo con los *Anopheles* y la malaria de los aeropuertos (Tatem y col., 2006), o en los coches que llegan con los barcos o en los mismos barcos, pero estas vías parecen poco probables y no han sido mencionadas en la literatura existente.

Los cambios medioambientales también podrían haber incidido en la emergencia de un foco de leishmaniosis canina en la isla tal y como ha sido mencionado (Desjeux, 2001; Gállego, 2004). Sin embargo, la isla de Menorca no ha sufrido grandes transformaciones en lo que se refiere a la construcción de zonas de viviendas unifamiliares, ajardinadas, que pudieran favorecer la presencia del vector como ha sido postulado (Ranque y col., 1975). Por otro lado, el vector se encontraba ya presente en la isla (Seguí, 1991a; b; c), y con una densidad suficiente en algunas zonas para que existiera riesgo de transmisión vectorial (Portús y col., 1994).

Con estas premisas, se decidió llevar a cabo un **estudio entomológico en Menorca** (2009) con objeto de comparar los resultados con los obtenidos por Seguí en 1988 (1991a; b; c) y estudiar los posibles factores que incidirían en los cambios que pudieran observarse (**ver capítulo 2**). Las capturas del 2009 en Menorca se hicieron por transectos, repitiendo los lugares de captura utilizados por Seguí e intentando reproducir al máximo el estudio realizado hace 20 años. Sorprendentemente, dicho estudio mostró que se habría producido una disminución de la densidad de la especie considerada vectora potencial, *P. perniciosus*. Estos resultados difieren de lo ocurrido en otras zonas de España en que se ha observado una emergencia o incremento de la leishmaniosis

asociada a un incremento de la densidad del vector (Gálvez y col., 2010; b; Martín-Sánchez y col., 2009).

Dado, como se ha comentado, que no se observó un cambio medioambiental evidente (nuevas áreas urbanizadas, construcción de carreteras, cambios en el uso del suelo) en Menorca en el transcurso de los años, se llevó a cabo un análisis de la posible influencia del cambio climático, otro de los factores considerados de riesgo para la emergencia o reemergencia de focos de leishmaniosis (Äspöck y col., 2008; Ready, 2010; Shaw, 2007). Dicho análisis mostró que la temperatura media del mes anterior al periodo de captura había disminuido 0,9°C en 2009 con respecto al año 1988 (años en que se realizaron las capturas) y que mostraba una correlación negativa con la densidad de *P. perniciosus*. Estos resultados estarían en desacuerdo con el modelo de Kuhn (1999), quien predice que el incremento de la temperatura haría disminuir la densidad de esta especie. Sin embargo, la densidad de *P. perniciosus* no mostró ninguna correlación, ni positiva ni negativa, con los factores climáticos en el estudio llevado a cabo en 2009, probablemente debido al hecho de que las capturas se realizaron en un periodo muy corto (4 días) y a la homogeneidad de la isla, desde el punto de vista altitudinal y bioclimático. Otra diferencia observada, entre los estudios de 1988 y 2009, fue la velocidad media del viento durante el periodo de captura, que habría disminuido de forma significativa 2,4km/h en 2009. Diversos autores han mencionado la influencia negativa de dicha variable climática tanto en la actividad de los flebotomos (Killick-Kendrick y col., 1984) como en la densidad (Branco y col., 2013). Así, si bien la disminución del viento no habría propiciado un incremento de la densidad de *P. perniciosus* en Menorca, podría haber favorecido que los flebotomos fueran más activos, saliendo de sus lugares de reposo y picando a los animales.

Otro factor que no ha sido tenido en cuenta en Menorca es el posible cambio en el periodo de actividad del vector y que, sin embargo, ha sido mencionado como una de las posibles causas de la emergencia de la leishmaniosis canina en Andalucía (Martín-Sánchez y col., 2009). También la edad fisiológica de los flebotomos (Portús y col., 1994). Sería aconsejable realizar dichos estudios en Menorca, conjuntamente con los mencionados de la infestación natural de los flebotomos.

No se puede descartar que la emergencia de la leishmaniosis canina en la isla sea debida a otras posibles vías de infección de la población canina, sin intervención del vector, como son la mecánica por mordedura (Shaw, 2007), congénita (Boggiatto y col., 2011;

Masucci y col., 2003), sexual (Riera y Valladares, 1996; Turchetti y col., 2014), o sanguínea (Bhang y col., 2013; de Freitas y col., 2006; Owens y col., 2001). Dichas vías se consideran excepcionales, pero se han mencionado en algunas zonas como en Estados Unidos y Canadá (Boggiatto y col., 2011; Duprey y col., 2006; Shaw, 2007). En Menorca, y para descartar la transmisión congénita, sería aconsejable realizar serologías a perros jóvenes que no hubieran pasado la época estival de actividad del vector.

A falta de realizar dichos estudios, se observa que en la isla de Menorca estaría emergiendo un foco de leishmaniosis, sin que éste esté directamente relacionado con un aumento de la densidad de *P. perniciosus*, y que las posibles causas serían la continua introducción de perros infectados y el incremento de la actividad del vector debido a una disminución del viento.

Los **estudios entomológicos** se utilizan en muchos casos como indicadores de la presencia de la/s especie/s vectora/s de la/s leishmaniosis y, por lo tanto, del riesgo de que se pueda presentar la enfermedad. En los últimos años, se están estandarizando dichos estudios con objeto de poder evaluar los factores que influyen en dicha presencia (Ballart y col., 2014; Barón y col., 2011; Farkas y col., 2011; Gálvez y col., 2010a; Morosetti y col., 2009; Ozbel y col., 2011, Rioux y col., 2013). La mayoría de éstos se han realizado con trampas de papel adhesivo, que permiten la captura de ejemplares de flebotomos en un corto periodo de tiempo y en un área de estudio relativamente grande. Dichas trampas no presentan ningún tipo de atracción (Alexander, 2000; Rioux y col., 1967) y se colocan, principalmente, en mechinales de muros resguardados, lugares donde los flebotomos se retiran a reposar (Léger y Depaquit, 1999). Se han utilizado fundamentalmente dos tipos de metodología para la colocación de estas trampas, los transectos (Ballart y col., 2014; Barón y col., 2011; Gállego y col., 1990; Rioux y col., 1967, 2013) y cubriendo cuadrículas de superficie de un área determinada (Gálvez y col., 2011). Para la presente memoria nosotros hemos realizado este tipo de estudio en las islas de Menorca (**ver capítulo 2**) y de Mallorca (**ver capítulo 3**). De ambas islas se disponía de datos entomológicos previos (Lladó y Rotger, 1990; Seguí, 1991a; b; c), pero parciales, sobre todo en la isla de Mallorca, y sin tener en cuenta la posible influencia de variables medioambientales y climáticas en la distribución de *P. perniciosus*, única especie potencialmente vectora capturada en ambas islas. No ha sido posible capturar *P. ariasi* en las 148 estaciones prospectadas de ambas islas, a pesar de

que se ha recogido su presencia en diversos mapas (Amela y col., 2012; Lucientes y col., 2005; Suarez y col., 2012).

Dado que los objetivos planteados en las dos islas no eran idénticos, la metodología utilizada tampoco ha sido exactamente la misma. En Menorca, se pretendía observar los posibles cambios producidos en la densidad de *P. perniciosus* que pudieran explicar la emergencia de la leishmaniosis canina en la isla, por lo que se utilizó el trampeo mediante transectos, al igual que en el estudio previo de 1988. Sin embargo, las trampas se colocaron según la metodología de EDEN, durante cuatro noches, tal y como se ha efectuado en Mallorca y en otros estudios recientes de España y otros países (Ballart y col., 2014; Barón y col., 2011; Farkas y col., 2011; Gálvez y col., 2010a; Özbel y col., 2011; Rioux y col., 2013).

Con respecto a las variables analizadas, se ha considerado un número inferior en Menorca (28) que en Mallorca (57), donde el estudio fue más exhaustivo, al abarcar la totalidad de la isla, e iba focalizado a observar la distribución de *P. perniciosus* y los factores que influían en dicha distribución. Además, Mallorca es más grande y geográficamente más heterogénea que Menorca, lo que ha permitido estudiar el efecto de un mayor número de variables sobre la presencia de *P. perniciosus*. De las variables incluidas finalmente en los estudios de ambas islas en el análisis bivalente (14), se ha observado la influencia positiva y/o negativa de tres de ellas con respecto a *P. perniciosus*: el asentamiento o categoría del lugar (en función de dónde está ubicado el punto de captura en referencia a la población más cercana: dentro de la población, en la periferia o entre poblaciones), la construcción del muro (en función de si es de piedra seca, de piedra con mortero o de cemento) y la flora adyacente (la vegetación más cercana, <100m, al punto de captura).

La ubicación de *P. perniciosus*, alejada de las poblaciones, se correlaciona positivamente con su presencia y/o densidad, tal y como se ha visto en otros estudios (Ballart y col. 2014; Barón y col., 2011; Gálvez y col., 2010a). La localización rural y alejada de los núcleos urbanos favorecería que se encontraran las condiciones idóneas para que el vector pueda desarrollar su ciclo terrestre (Maroli y col., 2013; Rioux y Golvan; 1969; Rioux y col., 2013). Además, la utilización de insecticidas en zonas urbanizadas haría disminuir la población de flebotomos (Alexander y Maroli, 2003; WHO, 2012).

También se ha detectado una correlación positiva en aquellas estaciones en las que el muro en el que se colocaron las trampas adhesivas estaba construido a base de ladrillo con mortero o de piedra con mortero. El otro tipo de muro muy frecuente en las islas estudiadas es de pared seca. Dichos muros están muy extendidos y presentan una gran cantidad de agujeros, lo que hace muy difícil que puedan ser muestreados en su totalidad y, por lo tanto, que la muestra sea representativa. Por otro lado, en este tipo de muros los agujeros están, en muchas ocasiones, intercomunicados, lo que facilita las corrientes de aire, que dificultarían la presencia de los flebotomos al serle desfavorable (Killick-Kendrick, 1999; Maroli y col., 2013; Rioux y Golvan, 1969).

En lo referente a la variable “flora adyacente”, se observa una influencia positiva de la vegetación natural en la presencia del vector en ambos estudios. Sin embargo, la categorización de dicha variable no ha sido igual en ambas islas, lo que hace difícil comparar los resultados. Así, en Mallorca se ha observado que la presencia de matorrales favorece la presencia del vector, mientras que en Menorca solamente podemos decir que la presencia del vector se ve favorecida en un entorno natural, no cultivado. Los entornos naturales se encuentran localizados alejados de las poblaciones humanas, mientras que en las áreas cultivadas, no naturales, la utilización de pesticidas podrían hacer disminuir la presencia y/o densidad de *P. perniciosus*.

La altura es una variable que se correlaciona positiva o negativamente con la presencia de los flebotomos según la especie considerada (Ballart y col., 2014). En nuestro caso, hemos analizado dicha influencia tan solo sobre las poblaciones de *P. perniciosus* de la isla de Mallorca, donde la variación altitudinal es más notable. Los resultados han permitido observar que en las estaciones alejadas del mar, por encima de los 50m, se detecta una mayor presencia de *P. perniciosus*. El ambiente húmedo y la presencia de viento, en nuestro caso brisa marina en las zonas costeras de la isla, dificultaría la actividad de *P. perniciosus*, tal y como ha sido mencionado (Maroli y col., 2013; Killick-Kendrick, 1999; Rioux y Golvan, 1969).

Con respecto a las variables climáticas, la temperatura afecta la actividad de los flebotomos y, en nuestras zonas, las temperaturas estivales permiten que éstos abandonen su estado de diapausa, salgan durante el crepúsculo y la noche de sus lugares de reposo y que las hembras piquen a los hospedadores vertebrados (Killick-Kendrick, 1999; Lucientes y col., 2005). En nuestro caso, no hemos podido observar la influencia de dicha variable en la presencia de *P. perniciosus*. En Menorca, los resultados podrían

deberse a la homogeneidad de la isla y a que las capturas se realizaron durante un periodo muy corto, cuatro días, mientras que en Mallorca la razón podría encontrarse en que la mayoría de las trampas fueron colocadas en áreas geográficas homogéneas, dada la dificultad en encontrar lugares adecuados donde colocar las trampas en zonas montañosas por encima de los 700 m. En Mallorca, *P. perniciosus* se ha capturado a unos intervalos de temperatura media, en los días de captura, que oscilan entre 19,6°C y 27,4°C, independientemente de la altura de la ubicación de las trampas, mientras que en Menorca el intervalo de temperatura en el que se ha capturado *P. perniciosus* oscila entre 25,04°C y 25,08°C. En el caso de Mallorca el estudio estadístico se ha llevado a cabo utilizando la presencia/ausencia de *P. perniciosus* como variable dependiente y se ha observado la presencia de flebotomos a un amplio rango de temperaturas en que los flebotomos son activos (temperaturas superiores a 15,6°C) (Killick-Kendrick, 1999). Dichos resultados coinciden con los de Ballart y col. (2014) quienes, sin embargo, y al realizar el estudio estadístico utilizando la densidad de *P. perniciosus* como variable dependiente encuentran una correlación positiva entre la temperatura y dicha densidad.

En nuestros estudios, no se ha observado, en general, una influencia de la posible presencia de animales sobre la detección de *P. perniciosus*, incluidos los perros. Para el estudio de dicha variable se ha considerado tanto la visualización de éstos como de rastros de su actividad en la vecindad del sitio de muestreo. Estos resultados coinciden con los de otros estudios (Ballart y col., 2014; Barón y col., 2011; Gálvez y col., 2010a) y estarían justificados por el comportamiento trófico oportunista de esta especie (de Colmenares y col., 1995; Jiménez y col., 2013). En Menorca, se ha observado un incremento de la densidad de *P. perniciosus* ante la visualización de gatos, dato de importancia epidemiológica por cuanto los gatos actúan como reservorios de *L. infantum* (Gramiccia, 2011; Martín-Sánchez y col., 2007; Millán y col., 2011). En cambio, en Mallorca, donde hemos diferenciado la categoría de animales vistos de la categoría de explotaciones ganaderas cercanas a los puntos de captura, se ha detectado que la presencia de explotaciones ovinas cerca favorece la presencia de *P. perniciosus*. Las granjas ovinas de dicha isla contienen un gran número de animales que, además, pernoctan en el exterior, coincidiendo con el momento en que los flebotomos son activos. En un estudio realizado en Marruecos se ha observado que *P. perniciosus* constituye una gran parte de la microfauna de los establos (Guernaoui y Boumezzough, 2009), donde la presencia de estiércol permitiría la cría de los flebotomos, detectada por

la captura de un gran número de machos recién emergidos en su proximidad. Otros estudios realizados con otras especies vectoras, como por ejemplo con *P. argentipes* en el subcontinente indio, muestran resultados contradictorios acerca de la influencia de la presencia de ganado, principalmente bovino (Bern y col., 2010).

Al intentar comparar los resultados entre islas, así como con los obtenidos por otros autores, nos hemos encontrado con dificultades a pesar de que la metodología estaba estandarizada, tanto a lo referente al tipo de trampas utilizadas, de papel adhesivo, como a los días de captura, cuatro noches. Ello podría deberse a diferentes motivos:

- Las variables analizadas por los distintos autores de acuerdo al tipo de estudio a realizar.
- La forma en cómo se agrupan dichas variables, distinta en función del número de estaciones prospectadas y también con el fin de obtener resultados menos dispersos y significativos.

Otra diferencia podría atribuirse a cómo se utiliza la variable dependiente, la presencia del vector, diferente en distintos estudios en España (Barón y col., 2011; Gálvez y col., 2010a). Así, en Menorca hemos utilizado la densidad de *P. perniciosus*, con objeto de poder analizar las diferencias entre los dos años de estudio, mientras que para Mallorca, se ha empleado la ausencia/presencia del mismo.

Dichas diferencias se acentúan cuando se utilizan diferentes tipos de trampas, como las CDC que, a diferencia de los papeles adhesivos ejercen un poder atrayente selectivo (Alexander, 2000; Gállego y col., 1992), y que han sido utilizadas en diversos puntos de la Península Ibérica (Branco y col., 2013; Gállego y col., 1992). También hace difícil la comparación de los diferentes estudios el hecho de que, en ocasiones, las especies vectoras no son las mismas en los diferentes focos, caso de la presencia mayoritaria de *P. ariasi* en algunas zonas pirenaicas de Lleida (Ballart y col. 2014) o de *P. perniciosus* en el sur de España (Barón y col., 2011), o que los resultados se presentan agrupando las dos especies vectoras, como es el caso de la Comunidad de Madrid (Gálvez y col., 2010a).

Los estudios sobre el vector, como los mencionados anteriormente, son imprescindibles para conocer la epidemiología de los focos de leishmaniosis en las distintas áreas y poder aplicar medidas de control. La complejidad del ecosistema biológico de vector-parásito-hospedador-medioambiente-clima, hace que sea necesario elaborar programas

de prevención que integren la vigilancia y control del parásito, el vector y el reservorio de la leishmaniosis (Alvar y col., 2004; Maroli y col., 2013; Palatnik de Sosa y Day, 2011; WHO, 2012).

Se han postulado métodos muy diversos para el control de la leishmaniosis y diferentes autores discuten la eficacia de las estrategias de control tradicionales (Costa, 2011; Solano-Gallego y col., 2009; 2011). Actualmente, dichas estrategias se centran principalmente en el diagnóstico precoz de la enfermedad (Ready, 2014; Stockdale y Newton, 2013), el tratamiento de humanos y animales infectados (Solano-Gallego y col., 2009, 2011; Oliva y col., 2010; Otranto y Dantas-Torres, 2013a; WHO, 2012), la búsqueda de moléculas idóneas para el tratamiento y control de la enfermedad (Moreno y col., 2014; Ready, 2008; Sabaté y col., 2014; Singh y Sundar 2014), el desarrollo de vacunas (Gramiccia y Gradoni, 2005; Duthie y col., 2012; Joshi y col., 2014; Martín-Martín y col., 2013; Palatnik de Sousa, 2012; Oliva y col., 2014; Ready, 2008, 2013, 2014) y la aplicación de distintas metodologías de lucha antivectorial (Amóra y col., 2009; Claborn, 2010; Hamilton, 2008; Sharma y Singh, 2008).

En lo que se refiere a la leishmaniosis humana, es importante reforzar la declaración de los casos (Amela y col., 2012). En España, dicha declaración fue obligatoria a nivel nacional desde 1982 hasta 1996 en que pasó a ser de declaración a nivel de las Comunidades Autónomas que así lo consideraron (RD 2210/1995). Recientemente, y posiblemente debido a los grandes cambios que han afectado la emergencia y re-emergencia de la leishmaniosis, se prevé que la enfermedad vuelva a ser de declaración obligada a nivel nacional (Proyecto de Orden de 26 de Noviembre de 2013 por la que se modifican los Anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995).

A pesar de que en las Islas Baleares la leishmaniosis humana es de declaración obligatoria se da una infra declaración, al igual que en el resto de España (Alvar y col., 2004; Amela y col., 2012). Por otro lado, no se tienen en cuenta en dichas declaraciones la infección por *L. infantum* en España de viajeros procedentes de zonas no endémicas así como la de los españoles que se han contaminado en otras áreas geográficas. Pavli y Maltezou (2010) mencionan 18 casos de leishmaniosis detectados en viajeros, desde 1995 a 2008, a nivel del estado español. De este modo consideran que la leishmaniosis aunque poco frecuente se puede considerar una infección emergente en los viajeros internacionales.

Con respecto a la leishmaniosis en el hospedador vertebrado, y por lo que respecta al humano, los datos existentes de los casos declarados permiten observar una distribución heterogénea de las leishmaniosis en las Islas Baleares.

En el caso de la leishmaniosis canina la OIE incluye a esta enfermedad en el listado de *Enfermedades, infecciones e infestaciones* y regula su notificación (OIE, 2011; 2014). En España, recientemente se ha recogido a la leishmaniosis en el Real Decreto 526/2014, en el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación en el Artículo 3, en función de diversos factores como pueden ser: la aparición por primera vez en España, o en una zona o compartimento, de cualquier cepa nueva del agente patógeno, el cambio repentino e inesperado de la distribución, el incremento en la incidencia o virulencia, o de la morbilidad o la mortalidad, la aparición en un nuevo tipo de hospedador, etc. Hasta la fecha, la enfermedad continúa sin ser notificada en nuestro país, por lo que no se disponen de datos oficiales. En las Baleares los existentes son parciales.

La detección temprana de casos humanos y caninos es fundamental para identificar los mecanismos de transmisión (Miró y Molina, 2006; Ready, 2014; Stockdale y Newton, 2013). Dicha detección, además de ofrecer datos de la prevalencia real de la enfermedad y de su incidencia y distribución, permitiría efectuar el tratamiento de los afectados.

Otra medida de profilaxis y control sería, como ha sido mencionado, la lucha antivectorial, a través de múltiples mecanismos incluyendo la utilización de pesticidas químicos, de bioinsecticidas, de plantas insecticidas, rociado de las viviendas y establos con insecticidas, así como la utilización de repelentes de insectos, de collares y mosquiteras impregnados con insecticidas, el uso de feromonas sintéticas análogas a las naturales que manipulan la comunicación química entre los flebotomos, la modificación del terreno y destrucción de los microhábitas de los flebotomos, etc. (Alexander y Maroli, 2003; Amóra y col., 2009; Desjeux, 2004; Hamilton, 2008; Ready, 2008; Sharma y Singh, 2008). Dicha lucha antivectorial no puede llevarse a cabo sin el conocimiento previo de la fauna de flebotomos de un área determinada y de los factores que influyen en la misma, tal y como se ha realizado en los estudios de Menorca y Mallorca (capítulos 2 y 3). La vigilancia entomológica ha permitido detectar las especies de flebotomos presentes y el vector potencial (*P. perniciosus*) de *L. infantum*, así como observar las áreas presumiblemente de mayor riesgo de circulación del vector y, consecuentemente, de la leishmaniosis. Con ello se podrían establecer programas de

control vectorial (químicos, medioambientales y de protección personal) para reducir o interrumpir la transmisión de la enfermedad. La OMS recomienda que se utilice más de un método en el contexto de una gestión integral de la enfermedad (WHO, 2012).

El control de los vectores y de los reservorios puede ser eficaz en la disminución de casos humanos, ya que la incidencia de la leishmaniosis humana está directamente relacionada con el número de perros infectados y con la presencia del vector (Martín-Sánchez y col., 2009; Miró y Molina, 2006). Por lo que respecta al control de los vectores, éste puede proporcionar una solución barata y práctica para evitar los casos de leishmaniosis, aunque es de elevada complejidad debido a todos los factores involucrados (Amóra y col., 2009). Además, la sociedad la acepta más fácilmente que sacrificar a los perros infectados (Alexander y Maroli, 2003), una de las medidas profilácticas para la lucha contra la leishmaniosis canina.

Diversos autores han descrito, en distintos momentos, una presunta relación entre el aumento o disminución de la leishmaniosis canina, en distintas localidades, y el uso de las medidas profilácticas que recomiendan los veterinarios en éstas (Dereure y col., 2009; Killick-Kendrick y col., 1997). Está ampliamente aceptado que la prevención de las picaduras de flebotomos en perros es eficaz en la reducción no sólo de la incidencia de la leishmaniosis canina (Ferroglío y col., 2008; Otranto y col., 2007), sino también del riesgo de infecciones humanas (Maroli y col., 2010). Las medidas preventivas actuales dirigidas a disminuir los casos de leishmaniosis canina se basan principalmente en el uso de insecticidas tópicos (Solano-Gallego y col., 2009, 2011), cuya eficacia ha sido demostrada en estudios experimentales (Killick-Kendrick y col., 1977; Mencke y col., 2003; Miró y col., 2007a) y en estudios de campo (Foglia y col., 2006; Maroli y col., 2001; Otranto y col., 2007; 2010). En la actualidad se conocen tres herramientas de prevención de la leishmaniosis canina de este tipo: collares, *spot-on* y rociar a los animales con productos químicos a base de piretroides sintéticos a distintas concentraciones (Alexander y Maroli, 2003; Quinnell y Courtenay, 2009; Sharma y Singh, 2008). Se ha visto que el uso de los collares con una formulación de imidacloprid (10%) y flumetrin (4,5%) ofrece a largo plazo (hasta 8 meses), una protección fiable contra la infección por *L. infantum* en zonas hiperendémicas (Otranto y col., 2013b). En España, existen muchos productos insecticidas (collares, pomadas, *spot-on*, ...), pero tan sólo se especifica que son efectivos contra los flebotomos los collares que incorporan deltametrina (Catálogo de Medicamentos, 2014). Dichos collares ofrecerían

una protección durante un mínimo de 6 meses (Killick-Kendrick y col., 1997). Otras aplicaciones, como *spot on*, con tratamiento tópico con 65% de permetrina ofrecen una actividad repelente de tres semanas y, en el caso de perros que viajan a zonas endémicas, se aconseja aplicarlo dos días antes de viajar (Molina y col., 2012a). Miró y col. (2007a) evalúan la eficacia de la aplicación tópica de imidacloprida 10%/permetrina 50%, observando que durante la primera semana de aplicación el efecto insecticida es significativo y, además, el producto muestra un efecto anti-alimentación potente, de más del 90%, por parte de los flebotomos durante las tres primeras semanas después de la aplicación, por lo que la aplicación de este producto cada 3 semanas sería una buena herramienta para reducir significativamente las picaduras de los flebotomos, durante el período de transmisión.

El uso generalizado de estas medida profilácticas, combinado con estrategias de control adicionales encaminadas a la reducción de la infección de los flebotomos por *L. infantum*, ayudaría a la disminución del riesgo de infección tanto en el caso de los humanos como de los perros (Dantas-Torres y col., 2011).

Al igual que otros autores (Ballart y col., 2013; Gálvez y col., 2011; Morosetti y col., 2009; Ruiz de Ybáñez y col., 2009), en el estudio realizado por nosotros (ver capítulo 2), hemos detectado que un elevado número de veterinarios (>90%) recomiendan en sus consultas medidas profilácticas (collar y *spot-on*) frente a la picadura del vector. Estos productos deben ser aplicados tanto a perros ya infectados como a perros sanos, ya que reducen el riesgo de nuevas infecciones evitando la picadura del flebotomo en ambos casos (Foglia y col., 2006; Gavgani y col., 2002; Maroli y col., 2001; Otranto y col., 2007; 2010). Esta es una medida que parece ser desconocida por los dueños de animales de países no endémicos que viajan a zonas endémicas, dado los casos de leishmaniosis canina detectados en los primeros después del desplazamiento de los animales (Menn y col., 2010; Poepl y col., 2013). Es de suponer que tampoco se habría aplicado a los animales que viajaban a la isla de Menorca, presumiblemente enfermos y que habrían permitido la emergencia de la leishmaniosis canina en la isla. Por otro lado, la seroprevalencia canina hallada en Menorca ha sido elevada, por lo que los dueños de los animales no deben seguir las indicaciones de los veterinarios.

Otras medidas útiles en la prevención de las picaduras de flebotomo son mantener al perro en ambientes de interior durante la época de actividad de los flebotomos y reducir los microhábitats favorables para estos (Alexander y Maroli, 2003; Maroli y col., 2010).

Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre el estado actual de la leishmaniosis canina en las Islas Baleares muestran que dicha medida no se aplica a los animales de la zona, que se encuentran en ambientes al exterior en muchos casos.

Entre los métodos empleados en la lucha contra los vectores ésta el uso de insecticidas en lugares comunes de descanso y alimentación de los flebotomos (Amóra y col., 2009; Sharma y Singh, 2008). Sin embargo, por motivos medioambientales no se permite su uso prolongado. Por otro lado, está siendo una acción muy debatida debido a los elevados costes, a las dificultades en la aplicación, a la posibilidad de contaminación y de crear resistencias (Amalraj y col., 1999). Otros autores señalan que el control del vector mediante la utilización de insecticidas es un método muy eficaz, aumentando la mortalidad del flebotomo lo que influye directamente en la transmisión de la leishmaniosis (Dye, 1996). En distintas zonas de Italia, India, Grecia, Israel se han implementado campañas basadas en la aplicación de insecticidas (Alvar y col., 2004; Alexander y Maroli, 2003) y ésta fue una medida eficaz en la reducción de la malaria en España y, secundariamente, de la leishmaniosis en nuestro país (Botet y Portús, 1993). La aplicación de estos insecticidas es eficaz en adultos pero se desconoce su eficacia sobre las distintas formas evolutivas del vector (Alexander y Maroli, 2003). Otro inconveniente de este tipo de acción es el hecho de que además de actuar sobre el vector de la leishmaniosis podría tener efecto sobre otras especies de insectos con el consiguiente daño ambiental (Alvar y col. 2004). En la actualidad no se aplican dichas medidas para la lucha contra la leishmaniosis en las Islas Baleares.

La modificación del terreno y de los lugares donde reposan y/o crían los flebotomos puede ser también útil en la disminución de la población de vectores y de la leishmaniosis. De las variables estudiadas por nosotros (ver capítulo 3), la construcción de los agujeros de drenaje con PVC podría favorecer dicha disminución, tal y como indican Barón y col. (2011). La construcción de dichos agujeros no favorece la presencia de animales que pueden ser una potencial fuente de alimentación para el flebotomo (reptiles, micromamíferos, ...), lo que conlleva también a la reducción de la materia orgánica producida por los residuos de estos animales, disminuyendo así las condiciones favorables para que pueda llegar a buen término el ciclo holometábolo de los flebotomos. En el estudio realizado en Mallorca se ha observado que la presencia de *P. perniciosus* disminuye en aquellos muros con agujeros de drenaje de PVC.

Para aplicar de forma adecuada las medidas de control de la leishmaniosis comentadas en las Islas Baleares, tanto frente al vector como frente al reservorio, consideramos necesaria la realización de estudios complementarios a los ya efectuados, entre los que se incluirían:

- Estudios prospectivos serológicos y moleculares de la leishmaniosis canina a gran escala en las dos islas estudiadas y aislamiento e identificación del parásito de los animales positivos mediante cultivo. Dichos estudios deberían incluir a los animales recién nacidos o que no hayan pasado por la época de transmisión vectorial, con objeto de descartar la transmisión congénita.
- Capturas de flebotomos en las proximidades de las zonas donde se encuentra el reservorio canino. Para ello, y dadas las características de los hábitats en que se encuentran los perros, sería necesario utilizar las trampas de luz. Además, la captura con estas trampas permitiría acceder a puntos más elevados de la isla de Mallorca y descartar de forma más definitiva la presencia de *P. ariasi* en la isla.
- Capturas periódicas de los flebotomos a lo largo del periodo de actividad, fundamentalmente estival, con objeto de observar su dinámica poblacional.
- Estudio del parasitismo del vector, a lo largo del verano, aplicando técnicas moleculares y confirmando los resultados por disección, aislando y caracterizando los parásitos.

VI.- CONCLUSIONS

L'aprenentatge és la capacitat de sorprendre's
Teresa Guardans

VI.- CONCLUSIONS

From the results obtained in this study we can draw the following conclusions, grouped under four main headings: A) Natural infection with *Leishmania* and blood-meal digestion of sandflies; B) Trends in canine leishmaniosis in the Balearic Islands; C) Sandflies in the Balearic Islands; and D) Environmental factors influencing the distribution of the potential leishmaniosis vector, *Phlebotomus perniciosus*, in the Balearic Islands.

A) Natural infection with *Leishmania* and blood-meal digestion of sandflies

1. The detection of *Leishmania* DNA from sandfly populations at three farms, in different counties of Catalonia, was related to the number of infected dogs found in each farm, as well as to the level of human leishmaniosis endemicity in the respective counties, showing the utility of the nested-PCR used in the epidemiological surveys of leishmaniosis.
2. The results provide new data on the vectorial capacity of *Phlebotomus ariasi* in a Pyrenean region of Spain (Ainet de Besan, Pallars Sobirà), considered a new area at risk of leishmaniosis.
3. No sandfly without a blood-meal gave positive nested-PCR results and a higher percentage of nested-PCR positivity was observed in females with increased blood digestion, showing the importance of studying blood-meal digestion for the incrimination of phlebotomine sandfly vectors and epidemiological surveys of leishmaniosis foci.

B) Trends in canine leishmaniosis in the Balearic Islands

1. Over 73.8% of surveyed veterinary clinics confirmed more than 10 cases of canine leishmaniosis-infected dogs in the last 12 months and the majority of the veterinarians (88.1%) considered the new diagnosed cases as autochthonous.
2. Fifty per cent of polled veterinarians from the Balearic Islands think that the incidence of canine leishmaniosis has not changed over time. Nevertheless, differing trends were observed between the islands of Majorca and Minorca, where 28.6 (8/28) and 50% (3/6), respectively, of the veterinarians think that the disease among dogs is increasing.

3. The seroprevalence of canine leishmaniosis in Minorca was 24% and 31% among animals whose whole lifetime had been spent on the island, showing the existence of an autochthonous focus of canine leishmaniosis.
4. The establishment of an autochthonous focus of canine leishmaniosis in Minorca does not seem to be related to an increase in *P. perniciosus* density but to the continuous introduction of leishmaniosis-infected dogs.

C) Sandflies in the Balearic Islands

1. In the present study, the sandfly fauna in the Balearic Islands consisted of four species: *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus sergenti*, *Phlebotomus papatasi* and *Sergentomyia minuta*. These four species are found in Majorca whilst *Phlebotomus papatasi* is not present in Minorca, where the species richness of sandflies has not changed over time (20 years).
2. The global density of *Phlebotomus perniciosus* in Minorca has decreased significantly since the study performed 20 years ago, specifically in rural areas, and was not found to be related to the detection of a new autochthonous focus of canine leishmaniosis in the island.
3. The decrease in *Phlebotomus perniciosus* density in Minorca could not be explained by environmental factors.
4. Among the climatic variables analysed that differed statistically between the two studied years (average minimum winter temperature, average temperature of the month before sampling, relative humidity of the month before sampling, annual average rainfall of the year before sampling, and the wind speed of the sampling period), only the average temperature of the month before sampling showed a correlation (negative) with *Phlebotomus perniciosus* density in Minorca, being 0.9°C less in 2009 than in 1988.
5. *Phlebotomus perniciosus* is distributed throughout the island of Majorca, from sea level to the mountains, being present in 70% of the capture sites, and therefore a risk of leishmaniosis transmission exists in any part of the island.

D) Environmental factors influencing the distribution of the potential leishmaniosis vector, *Phlebotomus perniciosus*, in the Balearic Islands

1. The influence of the environmental factors on the presence or density of *Phlebotomus perniciosus* differed according to the physiography of the area studied.
2. The data obtained in the bivariate analysis show a positive correlation between *Phlebotomus perniciosus* density in Minorca and a rural location, stone mortar walls, and the presence of cats, whilst its density shows a negative correlation with the presence of a nearby water course and adjacent arable flora.
3. The multivariate model revealed that the probability of finding *Phlebotomus perniciosus* in Minorca is higher in stone mortar walls and in the presence of cats.
4. In Majorca, the bivariate analysis showed that factors such as altitude, settlement, type of road, site category, general environment, adjacent flora, land cover, and presence of sheep farms are positively associated with the presence of *Phlebotomus perniciosus*, whilst wall construction (brick/mortar), non-arable areas, and the proximity of pigeon and bee farms correlate negatively.
5. The multivariate model revealed that the probability of finding *Phlebotomus perniciosus* in Majorca is higher at altitudes ranging from 51 to 150 m.a.s.l., with adjacent garrigue shrub vegetation, at the edge of or between settlements, and in proximity of a sheep farm.

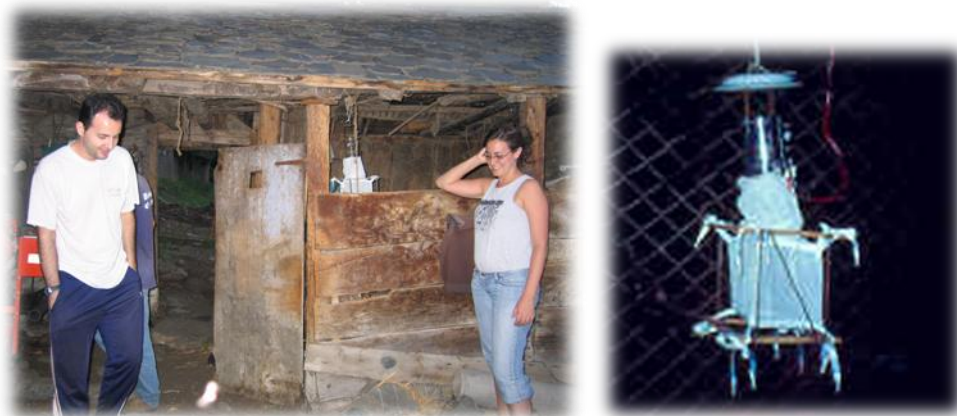
VII.- ANEXOS

“Una imagen vale más que mil palabras”

Kurt Tucholsky(¿)

VII.- ANEXOS

Anexo 1a. Captura de los flebotomos con trampas CDC



Captura con trampas CDC de los flebotomos



Recolección de los flebotomos



Conservación en N₂ líquido de los flebotomos

Anexo 1b. Distintos hábitats de captura de flebotomos con papeles adhesivos.



Hábitat marítimo (Mallorca)



Hábitat marítimo (Menorca)



Hábitat urbano (Mallorca)



Hábitat periurbano (Menorca)



Hábitat rural – Serra de Tramuntana
(Mallorca)



Hábitat rural (Menorca)

Anexo 1c. Distintos tipos de muro en las que se colocaron trampas de papel adhesivo



Muro de pared seca (Menorca)



Muro de cemento (Mallorca)



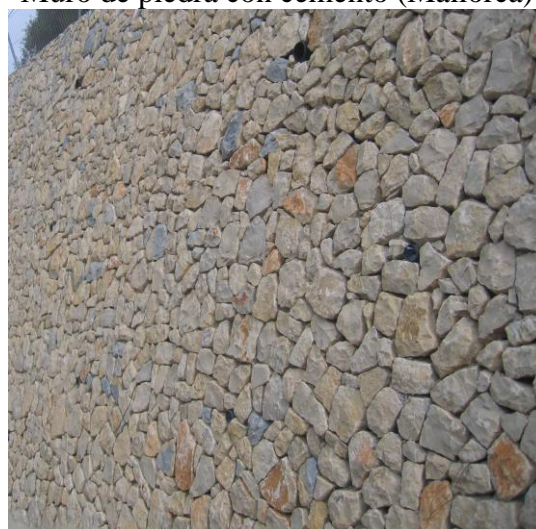
Muro de Cemento (Menorca)



Muro de piedra con cemento (Mallorca)



Muro de roca (Menorca)



Muro de piedra (Mallorca)

Anexo 1d. Distintos tipos de agujeros en los que se colocaron trampas de papel adhesivo



Agujero en roca natural (Menorca)



Agujero de roca y cemento, con vegetación (Mallorca)



Agujeros en pared seca (Menorca)



Agujero de drenaje de plástico (Mallorca)

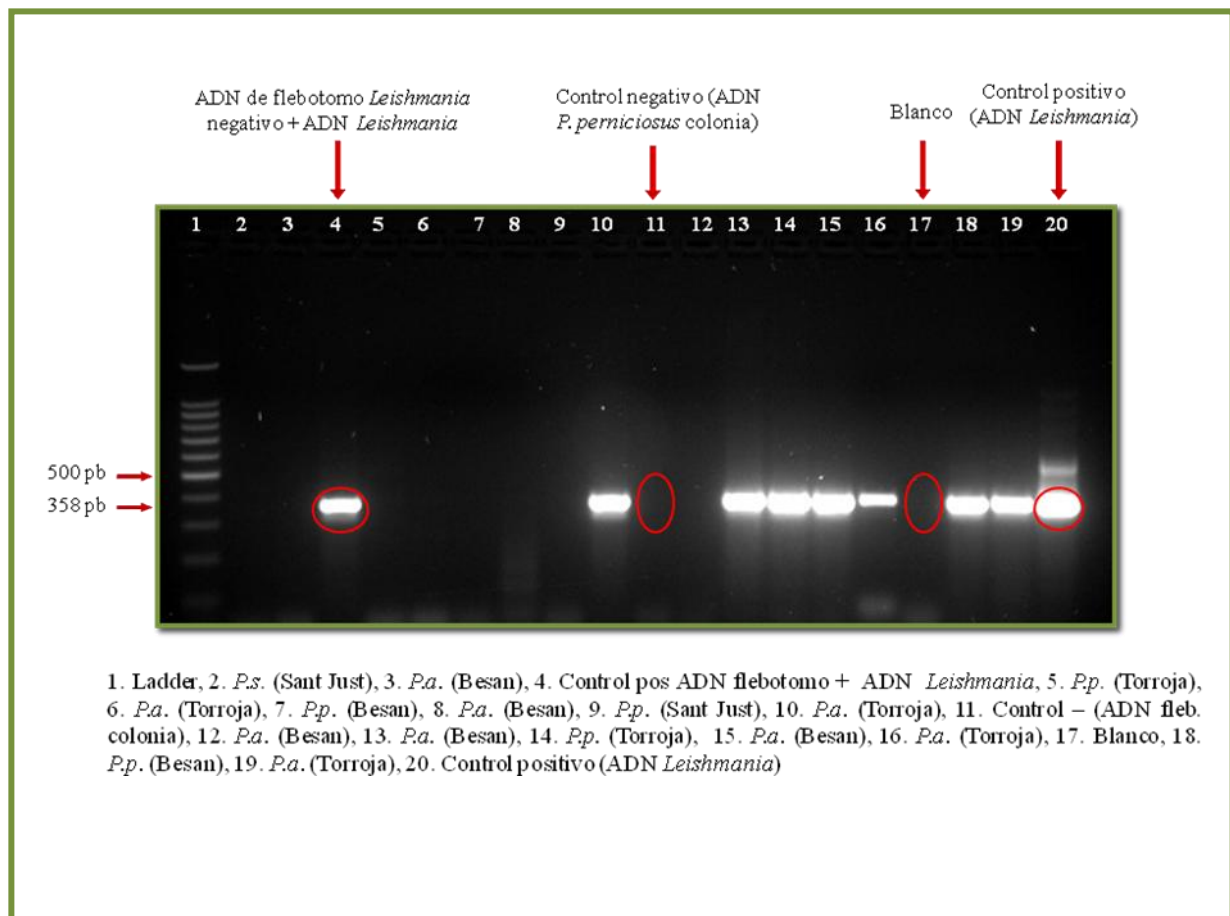


Agujero de roca con cemento (Mallorca)
















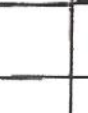
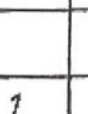
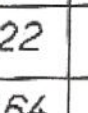



Agujero de cemento (Mallorca)

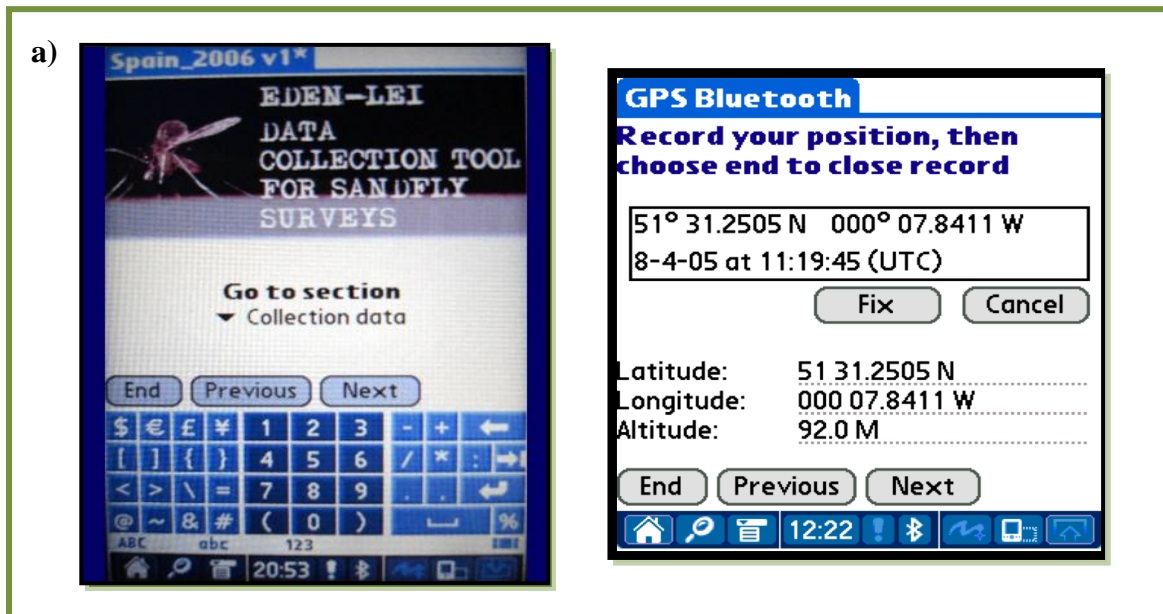
Anexo 2. Nested-PCR para el análisis de la infestación natural de los flebotomos por *Leishmania*.



Anexo 3. Grado de digestión y maduración de los ovarios de las hembras de flebotomo (Dolmatova y Demina, 1971)

Stades des ovaires		Stades de digestion					tubes de Malpighi
		I	II	III	IV	V	
1		344	30				
2		54	93				
3		50	545	63			
4			57	308	128		
5				38	342	1	
6					148	22	
7					19	164	
GLANDES ANNEXES							

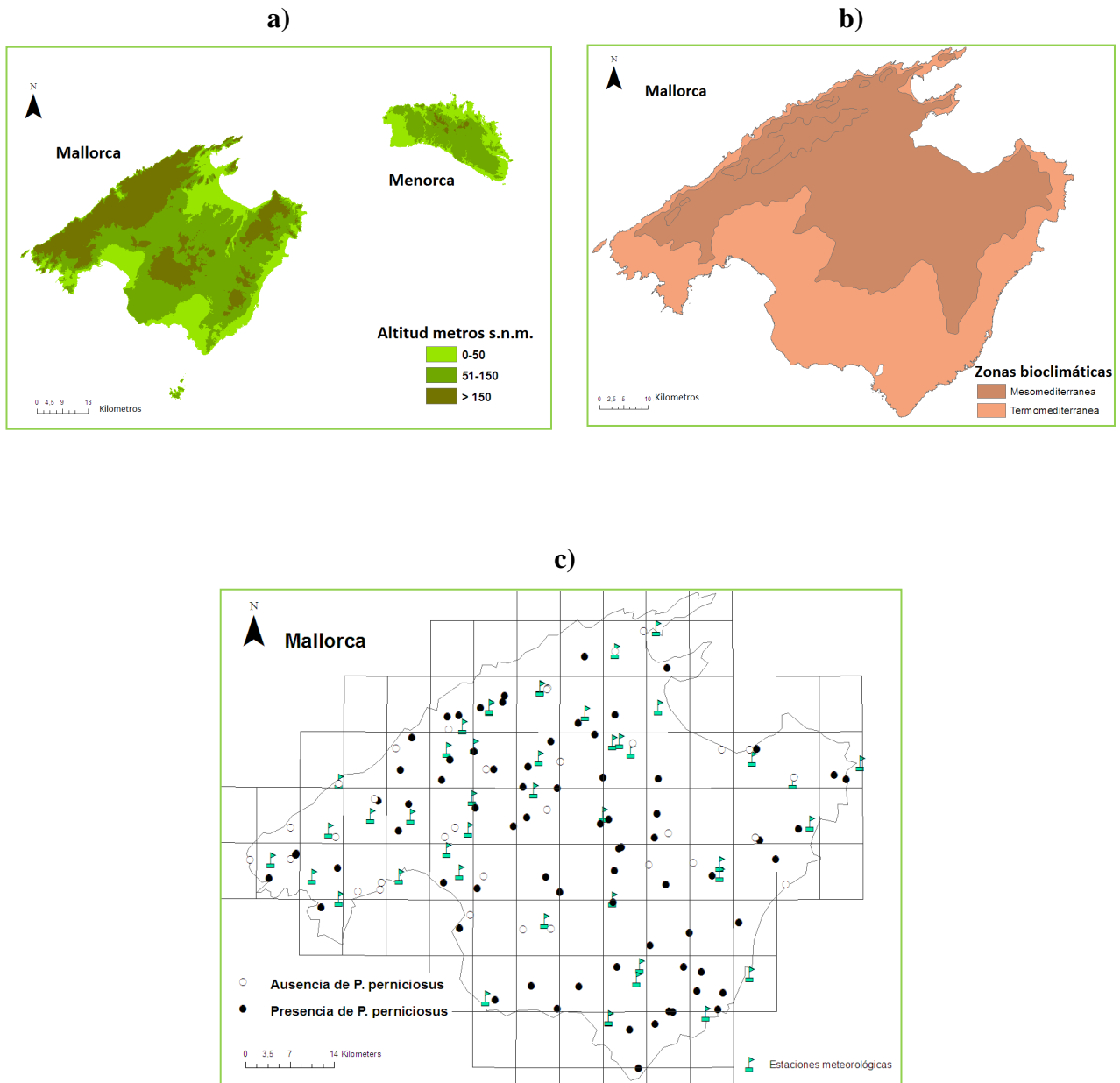
Anexo 4a. Sistema de recogida de datos en formato electrónico (a) PDA (Tungsten T5), programa Pendragon Form v.5.0.).



Anexo 4b. Sistema de recogida de datos en formato papel.

LOCALIZACIÓN			
6.Sitio		14. Asentamiento más cercano	
11. Altitud		16. Carretera	
12.Método medición altitud		17. Distancia población	
19. Comentarios localización			
CAPTURA			
22. Método de captura		26. Fecha de recuperación	
23. Trampas		28. Número de trampas recuperadas	
25. Fecha de colocación		29. Trampas en el suelo	
34. Comentarios		30. Humedad en el papel	
		31. Agujeros en el papel	
		32. Caracoles	
		33. Pegajoso?	
HÁBITAT			
37. Situación relativa al asentamineto		45. Construcción del muro	
38. Situación del lugar		46. Construcción del agujero	
39. Categoría del lugar		48. Interior del agujero	
40. Orientación		49. Humedad del agujero	
41. Pendiente		50. Vegetación en el muro	
42. Resguadado?		51. Residuos	
43. Cursos de agua?		52. Contenedores cerca	
44. Flujo de agua?		53. Comentarios	
MICROCLIMA			
55. Registro de temperaturas		67. Registro de Humedad relativa	
58. Tiempo metereológico		71. Humedad relativa	
59. Temperatura máxima		77. Comentarios	
60. Temperatura mínima			
MEDIOAMBIENTE			
84. Parque Natural		90. Uso de la tierra adyacente 1	
85. Ambiente general		91. Uso de la tierra adyacente 2	
86. Vegetación natural cercana 1 (100m-1Km)		92. Adyacente arable 1	
87. Vegetación natural cercana 2 (100m-1Km)		93. Adyacente arable 2	
88. Flora adyacente 1 (0 – 100m)		94. Adyacente jardin 1	
89. Flora adyacente 1 (0 – 100m)		95. Adyacente jardin 2	
FAUNA			
96. Perros	99. Vacas	102. Cabras	105. Patos
97.Gatos	100. Ovejas	103. Conejos	106. Palomas
98. Equinos	101. Cerdos	104. Gallinas	107. Otras aves grandes
Fotos:			

Anexo 5. Mapas obtenidos con el uso de ArcGis v.9.2. Se observan: a) rango altitudinal (m.s.n.m.) de la zona de estudio (Mallorca y Menorca), b) Zonas bioclimáticas de la isla de Mallorca, c) Estaciones meteorológicas de la isla de Mallorca y estaciones de captura.



Anexo 6. Ejemplares de flebotomos, montados con líquido de Hoyer y observados al microscopio, identificados de las Islas Baleares.



Cibario de
S. minuta



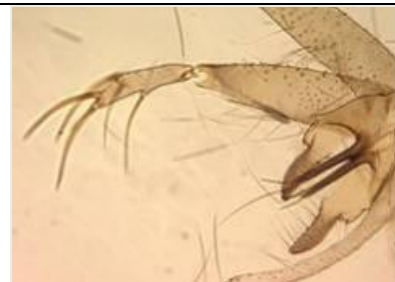
Espermatecas de *S. minuta*



Genitalia de *S. minuta*



Espermatecas de
P. perniciosus



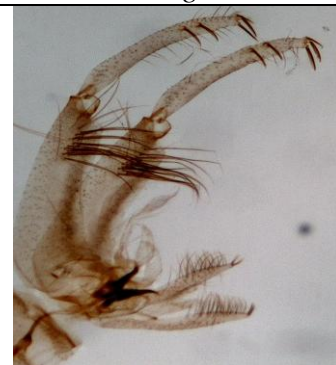
Genitalia de
P. perniciosus



Espermatecas de
P. sergenti

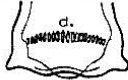
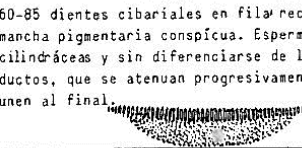
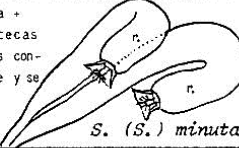

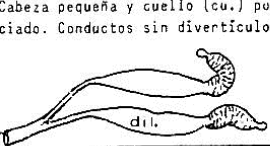
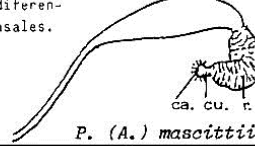

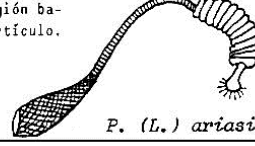
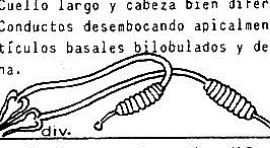
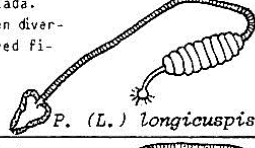

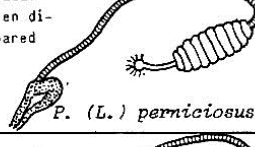
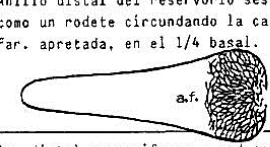
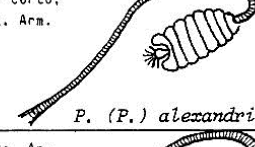

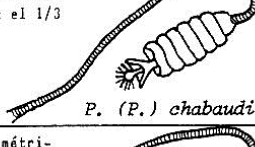

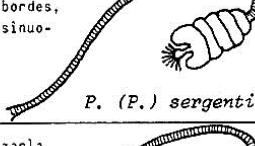
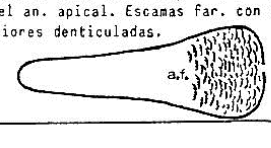
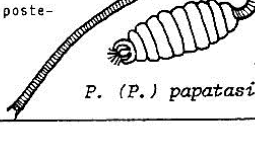


Genitalia de
P. sergenti






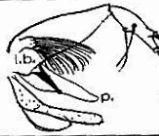


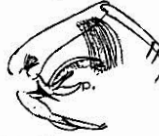


Genitalia de *P. papatasi*

Anexo 7a. Clave de identificación de las hembras de flebotomos de la Península Ibérica (Gállego y col 1992)

ESPECIES DE <i>Phlebotomidae</i> DE LA PENINSULA IBERICA (IMAGOS ♀)			
GENERO	SUBGENERO	CIBARIO / FARINGE / ESPERMOTECAS	ESPECIES
<p><i>Sergentomyia</i> Cibario armado con dientes (d.). Reservorio (r.) de la espermoteca liso.</p> 	<p><i>Sergentomyia</i> Con los caracteres del género.</p>	<p>50-85 dientes cibariales en fila recta + mancha pigmentaria conspicua. Espermotecas cilíndricas y sin diferenciarse de los conductos, que se atenuan progresivamente y se unen al final.</p> 	<p><i>S. (S.) minuta</i></p> 
<p><i>Phlebotomus</i> Cibario inerme.</p> 	<p><i>Adlerius</i> Conductos no anillados y dilatados en su región próxima al reservorio, no anillado y sí estriado transversalmente.</p>	<p>Cabeza pequeña y cuello (cu.) poco diferenciado. Conductos sin divertículos basales.</p> 	<p><i>P. (A.) mascittii</i></p> 
<p>Reservorio (r.) de la espermoteca con la superficie estriada o anillado y más o menos diferenciado del conducto (cd.); cabeza (cb.) de la espermoteca sesil o pedunculada.</p>	<p><i>Larrousius</i> Reservorios y conductos anillados, los conductos con dilatación no anillada (dil.) o con divertículos (div.) en su base; cabezas pedunculadas.</p>	<p>Cuello corto, poco diferenciado. Región basal del conducto dilatada; sin divertículo.</p> 	<p><i>P. (L.) ariasi</i></p> 
		<p>Cuello largo y cabeza bien diferenciada. Conductos desembocando apicalmente en divertículos basales bilobulados y de pared fina.</p> 	<p><i>P. (L.) longicuspis</i></p> 
		<p>Cuello largo y cabeza bien diferenciada. Conductos desembocando lateralmente en divertículos basales piriformes y de pared gruesa.</p> 	<p><i>P. (L.) perniciosus</i></p> 
	<p><i>Paraphlebotomus</i> Reservorios y conductos anillados, estos últimos sin modificaciones basales; cabezas sesiles. Armadura faríngea con aspecto reticulado.</p>	<p>Anillo distal del reservorio sesil y corto, como un rodete circundando la cabeza. Arm. far. apretada, en el 1/4 basal.</p> 	<p><i>P. (P.) alexandri</i></p> 
		<p>An. distal campaniforme y pedunculado. Arm. far. prolongada por los bordes hasta el 1/3 basal.</p> 	<p><i>P. (P.) chabaudi</i></p> 
		<p>An. distal globuloso y sesil, isodiamétrico. Arm. far. no prolongada por los bordes, con terminaciones apicales largas y sinuosas.</p> 	<p><i>P. (P.) sergenti</i></p> 
	<p><i>Phlebotomus</i> Reserv. y cond. anillados, sin modificaciones basales; cabezas sesiles. Arm. far. escamas en filas transversas.</p>	<p>Cabeza aparentemente grande por abrazarla el an. apical. Escamas far. con las posteriores denticuladas.</p> 	<p><i>P. (P.) papatasi</i></p> 

Anexo 7b. Clave de identificación de los machos de flebotomos de la Península Ibérica (Gállego y col., 1992)

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

Anexo 8. Cuestionario enviado a los veterinarios de las clínicas veterinarias de las Islas Baleares y elaborado en el proyecto EDEN

1. Identificació del veterinarí:
 Nom i COGNOMS:
 Nom de la Clínica:.....
 Adreça:.....
 Població: Comarca: Codi postal:
 Telèfon: Fax: Mòbil:
 e-mail: Pàgina web:

2. Tipus de clientela: Urbana Rural Mixta Altre
 Si altre, especificar:

3. Quants gossos rep en consulta per setmana?
 0 1-3 4-10 11-20 mes de 20

4. Quants gossos sospitosos de Leishmaniosi ha vist en los últims 12 mesos?
 0 1-5 6-10 11-20 21-50 mes de 50

5. Sobre quins signes clínics basa les seves sospites?

Síntoma	Freqüència			Importància dintre de la sospita diagnòstica (+ a +++)
	Rar	Freqüent	Mes freqüent	
Aprimament				
Baixa forma				
Anèmia				
Hipertèrmia				
Epistaxis				
Alopècia localitzada				
Escamosi				
Onicogrifosi				
Ulceracions				
Adenopaties				
Lesiones oculars				
Lesiones renals				
Esplenomegàlia				
Altra				

6. Quants casos confirmats de Leishmaniosi canina ha vist durant els 12 últims mesos?
 0 1-5 6-10 11-20 21-50 més de 50

7. Quants d'aquets casos confirmats varen ésser nous?
 0 1-5 6-10 11-20 21-50 més de 50

8. Per quin mètode es van confirmar aquests casos?

- Epidemiologia
 Només clínica
 Serologia: IFI
 ELISA
 Kit de detecció ràpida
 Formoleucogelificació
 PCR
 Parasitologia (Microscòpia): Punció ganglionar
 Punció de medul·la óssa
 Biòpsia cutània
 Altre, especificar:.....

9. Aquest cas foren confirmats:

- en la seva consulta-laboratori ,
 va necessitar ajuda d'un laboratori privat ?
 va necessitar ajuda d'un laboratori veterinari comarcal o oficial ?
 Especificar.....
 Altre especificar:.....

10. Creu que aquests gossos van ésser infectats en la seva zona d'activitat?
 si no

11. Té la sensació que el nombre de casos de Leishmaniosi canina ha evolucionat entre la seva clientela en el curs dels 10 últims anys cap a un:

- Augment Disminució Cap evolució

12. ¿Quina mesura de prevenció recomana als propietaris dels gossos?

- Collar Spot on Spray Xampú Cap

13. Si vostè no recomana mesures profilàctiques, es per que:

- No les considera eficaces
 Són massa costoses
 No sap on aconseguir-les
 El risc de leishmaniosis no és important
 Altra especificar:

14. Venen indicades les presentacions antiparasitàries amb la indicació «lluïta contra els flebòtoms»?:

- si no

15. Comenti les observacions que cregui oportunes

Anexo 9. Ficha de la leishmaniosis canina utilizada en los estudios prospectivos y elaborada en el proyecto EDEN.

DATOS DEMOGRÁFICOS DEL PERRO	DATOS DEL VETERINARIO	CUESTIONARIO DEL PROPIETARIO DEL PERRO	
Nombre	Apellidos y Nombre	Apellidos y Nombre	
Longitud del pelo: Corto <input type="checkbox"/> Medio <input type="checkbox"/> Largo <input type="checkbox"/>	Dirección	Dirección	
Color del pelo	Ciudad	Longitud Latitud	
Sexo: M <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> Si hembra, ¿está preñada?	Provincia y comarca	Ciudad	
Fecha de nacimiento / /	Código postal	Provincia y comarca	
Edad (años)	Teléfono	Código postal	
Peso (kg)	e-mail	Teléfono	
Raza	SIGNOS CLÍNICOS COMPATIBLES CON LA LEISHMANIOSIS CANINA	e-mail	
País de origen		¿Ha oído hablar de la leishmaniosis visceral?: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
Región de origen	DATOS EXTRACCIÓN Formulario No. _____ Tipo de muestra Suero <input type="checkbox"/> Muestra cutánea <input type="checkbox"/> Sangre periférica <input type="checkbox"/> Ganglio linfático <input type="checkbox"/> Médula ósea <input type="checkbox"/> Otra <input type="checkbox"/> Si otra, especificar: _____ TEST DIAGNÓSTICO Microscopio <input type="checkbox"/> ELISA <input type="checkbox"/> IFAT <input type="checkbox"/> WB <input type="checkbox"/> Cultivo in vitro <input type="checkbox"/> PCR <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> (especificar) _____	¿Qué posibilidad cree que tiene su perro de padecer leishmaniosis a lo largo de su vida? 0% <input type="checkbox"/> 5% <input type="checkbox"/> 10% <input type="checkbox"/> 20% <input type="checkbox"/> 50% <input type="checkbox"/> 50-90% <input type="checkbox"/> 90-100% <input type="checkbox"/>	
Provincia de origen		Ninguno <input type="checkbox"/> Inflamación de ganglios linfáticos <input type="checkbox"/> Dermatitis furfurácea <input type="checkbox"/> Alopecia <input type="checkbox"/> Úlceras <input type="checkbox"/> Onicogriposis <input type="checkbox"/> Epistaxis <input type="checkbox"/> Palidez mucosas <input type="checkbox"/> Lesiones oculares <input type="checkbox"/> Esplenomegalia <input type="checkbox"/> Pérdida de peso <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> (especificar): _____	¿Conoce algún método para proteger a su perro de las picadas de los flebotomos? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
RESIDENCIA HABITUAL DEL PERRO			Si SÍ, ¿ha oído hablar de alguna medida para proteger a su perro contra la LV? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
Dirección			¿Ha utilizado alguna medida para proteger a su perro contra la LV? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si SÍ, ¿cuáles?
Localidad			Collar <input type="checkbox"/> Scalibor <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> (especificar): _____
Comarca Provincia			¿Aplica a su perro algún otro insecticida para protegerlo de la picada de otros insectos o de garrapatas? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si SÍ, proporcione detalles
Long Lat			
Reside en: En vivienda <input type="checkbox"/> En exterior <input type="checkbox"/> En perrera <input type="checkbox"/>			
Hábitat usual: Urbano <input type="checkbox"/> Periurbano <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Plano <input type="checkbox"/> Montaña <input type="checkbox"/>			
Refugio nocturno/vivienda: Exterior <input type="checkbox"/> Interior <input type="checkbox"/>			
Ocupación del perro: Mascota <input type="checkbox"/> Guardia <input type="checkbox"/> Ovejero <input type="checkbox"/> Cazador <input type="checkbox"/> Perrera <input type="checkbox"/> Vagabundo <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> (especificar): _____			
Vive con otros perros: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si SÍ, ¿cuántos?	Resultado Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>	Shampoo <input type="checkbox"/> (especificar): _____	
Vive con otros animales: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si SÍ, ¿cuáles?	Título	Si NO aplica profilaxis, ¿por qué? No lo puedo encontrar en la tienda <input type="checkbox"/> Demasiado caro <input type="checkbox"/> No creo que funcione <input type="checkbox"/> La LV no es importante <input type="checkbox"/> Otro (especificar) <input type="checkbox"/>	
Desplazamientos/viajes: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si SÍ, detalle de los lugares Si SÍ, periodo	Observaciones		

Anexo 10. Técnicas serológicas utilizadas en el diagnóstico de la leishmaniosis canina.

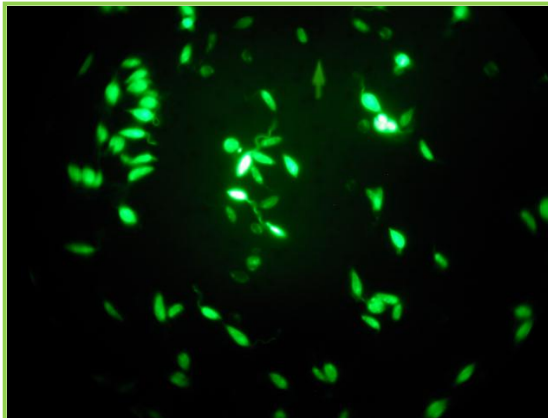
a) ELISA



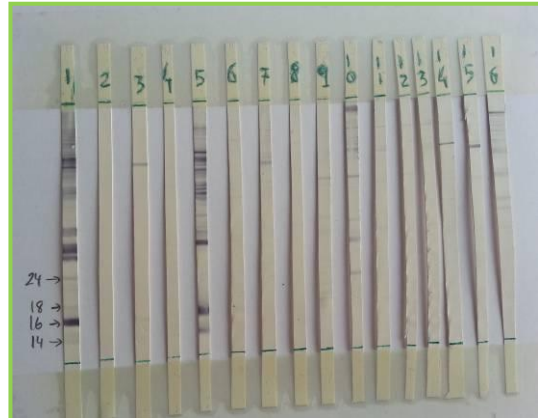
b) ICF



c) IFI



d) WB



VIII.- BIBLIOGRAFÍA

“Aprendemos cuando
se transfiere lo que se aprende a situaciones nuevas”

F. Deligny

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abellan García C. (1997). Epidemiología de la leishmaniosis en España. Programas y medidas de control. IZSS/MZCC/WHO. Workshop on New Trends in Leishmaniasis Epidemiology and Control in the Mediterranean area, Palermo (Italy), 11 – 13 September.
- Abonnenc E. (1972). Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae). *Cahiers de l'ORSTOM*, 55: 289.
- Abranches P, Conceição-Silva FM, Silva-Pereira MCD. (1986). La leishmaniose visceral dans la région de Lisbonne. Identification enzymatique. Interprétation structural du foyer. In: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. IMEEE, Montpellier: 427 - 432.
- Acardi SA, Liotta DJ, Santini MS, Romagosa CM, Salomón OD. (2010). Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Memorias Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105 (6): 796-799.
- Adler S, Theodor O. (1930). Infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead with *Leishmania infantum*. *Nature*, 127: 437.
- Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, De Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, Portús M. (1988). Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs With leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(2):154–159.
- Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. (2002). Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infection Diseases*, 8 (12): 1480-1485.
- Alexander B, Maroli M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 1-8.
- Alvar J. (2001). Las Leishmaniasis: de la Biología al Control. Laboratorios Intervet S.A. Salamanca.

- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. (1997). Leishmania and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years. *Clinical Microbiology reviews*, 10, 2: 298-319.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. (2004). Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57: 1–88.
- Alvar J, Ortiz M. (1987). Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en la provincia de Madrid. *Revista Ibérica Parasitologica*, Vol. Extra: 45 – 50.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, OMS Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7: e35671.
- Amalraj DD, Sivagnaname N, Srinivasan R. (1999). Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) to insecticides, *Journal of Communicable Diseases*, 31 (3): 177–180.
- Amela C, Suarez B, Isidoro B, Sierra MJ, Santos S, Simón F. (2012). Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES), Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Madrid.
- Amóra SSA, Bevilaqua CML, Feijó FMC, Alves ND, Maciel MV. (2009). Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotropical Entomology*, 38 (3): 303-310.
- Antinori S, Gianelli E, Calattini S, Longhi E, Gramiccia M, Corbellino M. (2005). Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travellers. *Clinical microbiology and infection*, 11 (5): 343-346
- Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V, Volf P. (2013). The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Eurosurveillance*, 18 (30): 20540.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. (2000). Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Semi-nested PCR on Mitochondrial Kinoplastic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5): 1933-1938.

- Aransay AM, Testa JM, Morillas-Márquez F, Lucientes J, Ready PD. (2004). Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitology Research*, 94: 416–420.
- Ashford RW. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal of Parasitology*, 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. *Wiener klinische Wochenschrift*, 120 (Suppl 4): 24-29.
- Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Asgari Q, Yaghoobi-Ershadi MR. (2008). First detection of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus (Larroussius) major* (Diptera: Psychodidae) from Iran. *Journal Medical Entomology*, 45 (4): 726-731.
- Ballart C, Alcover MM, Picado A, Nieto J, Castillejo S, Portús M, Gállego M. (2013). First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study. *Preventive Veterinary Medicine*, 109: 116–127.
- Ballart C, Barón S, Alcover MM, Portús M, Gállego M. (2012). Distribution of phlebotomine sand flies (diptera: Psychodidae) in Andorra: First finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta Tropica*, 122: 155-159.
- Ballart C, Guerrero I, Castells X, Barón S, Castillejo S, Alcover MM, Portús M, Gállego M. (2014). Importance of individual analysis of environmental and climatic factors affecting the density of *Leishmania* vectors living in the same geographical area: the example of *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus* in Northeast Spain. *Geospatial Health*, 8: 367–381.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer LI. (2008). Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24: 324-330.
- Bañuls AL, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. (2011). Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 17: 1451–1461.

- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. (2007). *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*, 64: 455–458.
- Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Irigaray C, Martín-Sánchez J. (2011). Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology*, 138: 1234–1244.
- Bart A, van Thiel PP, de Vries HJ, Hodiament CJ, Van Gool T. (2013). Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence based species typing from 195 patients. *Euro Surveillance*, Jul 25; 18 (30): 20544.
- Bates PA. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37: 1097–1106.
- Bates PA. (2008). Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 340–344.
- Bates PA, Rogers ME. (2004). New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania. *Current Molecular Medicine*, 4: 601-609.
- Bern C, Courtenay O, Alvar J. (2010). Of cattle, sand flies and men: a systematic review of risk factor analyses for South Asian visceral leishmaniasis and implications for elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9, 4 (2): e599.
- Bhang DH, Choi US, Kim HJ, Cho K, Shin S, Youn HJ, Hwang CY, Youn HY. (2013). An Autochthonous Case of Canine Visceral Leishmaniasis in Korea. *Korean Journal Parasitology*, Vol. 51, No. 5: 545-549.
- Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA. (2011). Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *Plos Neglected Tropical diseases*, Vol. 5 (4): e1019.
- Boletines Epidemiológicos Semanales del Ministerio de Sanidad y Consumo. (1982–1996).

- Botet Fregola J, Portús Vinyeta M. (1993). La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico – bibliográfica (1912 – 1985). *Revista Sanidad Higiene Pública*, 67: 225 – 266.
- Bourdeau P, Saridomichelakis MN, Oliveira A, Oliva G, Kotnik T, Gálvez R, Foglia-Manzillo V, Koutinas AF, Pereira da Fonseca I, Miró G. (2014). Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasit & Vectors*, 24: 110.
- Branco S, Alves-Pires C, Maia C, Cortes S, Cristovão JMS, Gonçalves L, Campino L, Afonso MO. (2013). Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Tropica*, 125: 339-348.
- Campino L, Cortes, S, Dionísio L, Neto L, Afonso MO, Maia C. (2013). The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Memorias do Instituto Oswaldo*, 108: 516-518.
- Cardoso L, Schallig HDFH, Neto F, Kroon N, Rodrigues M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica*, 91: 95–100.
- Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha Lima ACVM, Gontijo CMF. (2008). Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania*-Endemic Area of Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8 (3): 407-414.
- Catálogo de Medicamentos. (2014). Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
- Chicharro C, Nieto J, García E, Cruz I, Cañavate C, Flores M, Cuadrado J, Alvar J. (2004). Epidemiology of canine leishmaniasis in Ibiza (Balearic Islands). Comparative study of different diagnosis methods. Proceedings of the Ninth European *Multicolloquium of Parasitology*, Valencia (Spain).
- Chitimia L, Muñoz-García CI, Sánchez-Velasco D, Lizana V, Del Río L, Murcia L, Fisa R, Riera C, Giménez-Font P, Jiménez-Montalbán P, Martínez-Ramírez A, Meseguer-Meseguer JM, García-Bacete I, Sánchez-Isarria MA, Sanchís-Monsonís G, García-Martínez JD, Vicente V, Segovia, M, Berriatua E. (2011). Cryptic leishmaniosis by

- Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Veterinary Parasitology*, 181: 12-16.
- Claborn DM. (2010). The biology and control of leishmaniasis Vectors. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2 (2): 127-134.
 - Coelho WM, Bresciani KD. (2013). Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in a dipteran of species *Tabanus* importunes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22: 605-607.
 - Collantes F, Martínez-Ortega E. (1997). Estudio biométrico de las poblaciones del subgénero *Larroussius* (Díptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) del sureste de la Península Ibérica. *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 21: 33-47.
 - Cortés S, Vaz Y, Neves R, Maia C, Cardoso L, Campino L (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 26: 189-196.
 - Costa CH. (2011). How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44 (2): 232-242.
 - Croft AM, Taylor NA, Rodenhurst KE. (2006). Sandflies and leishmaniasis. *Lancet*, 367 (9505): 112.
 - Croset H, Rioux JA, Léger N, Houin R, Cadi Soussi M, Benmansour N, Maistre M. (1978). Les méthodes d'échantillonnage des populations de phlébotomes en région Méditerranéenne. *Colloques Internationaux du CNRS. Ecologie des Leishmanioses*, N° 239: 139 – 151.
 - Dantas-Torres F. (2011). Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology*, 27: 4.
 - de Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. (2003). Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 861-870.
 - de Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Wolff M, Seguí, G. (1995). Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *Journal of Medical Entomology*, 32: 229-233.

- de Freitas E, Norma Melo M, Pimenta da Costa-Val A, Marques Michalick MS. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137: 159 – 167.
- de Moraes RC, Gonçalves-de-Albuquerque Sda C, Pessoa e Silva R, Costa PL, da Silva KG, Brandao-Filho SP, Dantas-Torres F, de Paiva-Cavalcanti M. (2013). Detection and quantification of *Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. *Veterinary Parasitology*, 23: 506-508.
- Decret 15/1997, de 23 de gener, pel qual es crea i regula la Xarxa de Vigilància Epidemiològica en la Comunitat Autònoma de les Illes Balears BOCAIB Núm. 17 08-02-1997: 1706-1708.
- Dedet y Pratlong. (2003), Leishmaniasis. En: Manson's Tropical Diseases Capítulo 75: 1340 – 1364. Editado por Gordon C Cook y Alimuddin Zumla. 21st edición.
- Depaquit J, Léger N, Killick-Kendrick R. (1998). Description de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) Riouxi* N. Sp. (Diptera-Psycodidae) d'Afrique du Nord. *Parasite*, 5: 151- 158.
- Dereure J. (1999). Réservoirs des Leishmanies. En: Les Leishmanioses. Dedet J.P. ed. Collection Médecine tropicale de l'AUPSELF-UREF. Marketing/Ellipses, 109-127.
- Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martinez S, Pratlong F, Balard 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 and Zoonotic Diseases*, 9: 687-694.
- Desjeux P. (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinical Dermatology*, 14 (5): 417-423.
- Desjeux P. (2001). Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, 190: 77-79.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 27: 302 – 318.
- Di Muccio T, Marinucci M, Frusteri L, Maroli M, Pesson B, Gramiccia M. (2000). Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larrousius*

- (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 387–393.
- Díaz Sáez V, Morales Yuste M, Merino Espinosa G, Barón López S, Pesson B, Lucientes Curdi, J, Corpas López V, Martín Sánchez J, Morillas Márquez F. (2013). Presencia de *Phlebotomus Langeroni* (diptera, phlebotomidae) en el sur de España. Libro de resúmenes del Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. 17 – 20 Septiembre, P-TF.25Página 199.
 - Dolmatova AV, Demina NA. (1971). Les Phlébotomes (Phlebotominae) et les Maladies qu'ils transmettent. Editions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (O.R.S.T.O.M.) Initiations-Documentations Techniques, 18: 167.
 - Dostálová A, Volf P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview *Parasites & Vectors*, 5: 276.
 - Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*, 41: 571–579.
 - Dufour B, Moutou F, Hattenberger AM, Rodhain F. (2008). Global change: impact, management, risk approach and health measures – the cases of Europe. *Revue Scientifique et Technique (International Office Epizootics)*, 27 (2): 541-550.
 - Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbek Y, Boelaert M. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (7): 1013-1028.
 - Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. (2006). Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2002-2003. *Emerging Infected Diseases*, 12: 440 – 446.
 - Durán-Martínez M, Ferroglio E, Acevedo P, Trisciuglio A, Zanet S, Gortázar C, Ruiz-Fons F. (2011). *Leishmania infantum* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) Phlebotomine Sand Fly Vectors in Continental Mediterranean Spain. *Environmental Entomology*, 42: 1157-1165.
 - Duthie MS, Raman VS, Piazza FM, Reed SG. (2012). The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine*, 30: 134-141.

- Dye C. (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55 (2): 125–130.
- El cambio climático en España. Estado de situación. Documento resumen Noviembre de 2007 (2007). Informe para el Presidente del Gobierno elaborado por expertos en cambio climático. Accesible en:

http://www.magrama.gob.es/es/cambio-climatico/publicaciones/documentos-de-interes/ad_hoc_resumen_tcm7-12460.pdf.
- Farkas R, Tánczos B, Bongiorno G, Maroli M, Dereure J, Ready PD. (2011). First Surveys to Investigate the Presence of Canine Leishmaniasis and Its Phlebotomine Vectors in Hungary. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7): 823 – 834.
- Feliciangeli MD. (2004). Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 18: 71-80.
- Ferroglio E, Maroli M, Gastaldo S, Mignone W, Rossi L. (2005). Canine Leishmaniasis, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (10): 1618-1620.
- Ferroglio E, Poggi M, Trisciuglio A. (2008). Evaluation of 65% Permethrin Spot-on and Deltamethrin impregnated Collars for Canine *Leishmania infantum* Infection Prevention. *Zoonoses and Public Health*, 55: 145 – 148.
- Ferroglio E, Zanet S, Mignone W, Poggi M, Trisciuglio A, Bianciardi P. (2013). Evaluation of a Rapid Device for Serological Diagnosis of *Leishmania infantum* Infection in Dogs as an Alternative to Immunofluorescence Assay and Western Blotting. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20: 657–659.
- Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Veterinary Parasitology*, 83: 87-97.
- Foglia Manzillo V, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, 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. *Veterinary Parasitology*, 142 (1-2): 142-145

- Fulls setmanals de Vigilància Epidemiològica, 2002 – April 2014. Servei d'Epidemiologia. Direcció General de Salut Pública i Consum. Conselleria de Salut del Govern Balear.

<http://www.caib.es/sacmicrofront/contenido.do?idsite=337&cont=9268&lang=ca&cam pa=yes>.
- Gállego J, Botet J, Gállego M, Portús M. (1992). Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. In Memoriam al Prof. Dr. D. F. de P. Martínez Gómez. *Hernández S. Córdoba: Publicaciones de la Universidad de Córdoba*, 581–600.
- Gállego Culleré M. (1997). Los flebotomos vectores de la Leishmaniosis canina. Consideraciones generales. *Canis et Felis*, 29: 21-31.
- Gállego M. (2004). Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23: 661-676
- Gállego M, Prantlong F, Riera C, Muñoz C, Ribera E, Fisa R, Rioux JA, Dedet JP, Portús M. (2002). Isoenzymatic identification of *Leishmania* isolates from repeated clinical human leishmaniasis episodes in Catalonia (Spain). *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 96: 45-47.
- Gállego M, Rioux JA, Rispail P, Guilvard E, Gállego J, Portús M, Delalbre A, Bastien P, Martínez-Ortega E, Fisa R. (1990). Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Revista Ibérica ParasitologíaK*, 50: 123 – 127..
- Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, Martín O, Dos Santos-Brandao F, Guerrero I, Cubero E, Molina R. (2010a). Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Tropica*, 115: 95-102.
- Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Molina R. (2011). Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Preventive Veterinary Medicine*, 102: 59–65.
- Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R. (2010b). Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Veterinary Parasitology*, 169: 327–334.

- Garnham PCL. (1965). The *Leishmania* with special reference to the role of animal reservoir. *American Zoologist*, 5: 141-151.
- Gavgani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. (2002). Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomized trial. *Lancet*, 360 (9330): 374-379.
- Geisweid K, Mueller R, Sauter-Louis C, Hartmann K. (2012). Prognostic analytes in dogs with leishmania infantum infection living in a non-endemic area. *The Veterinary Record*, 171 (16):399
- Generación de escenarios regionalizados de cambio climático para España. (2009). Agencia estatal de Meteorología, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Accesible en:

http://www.aemet.es/documentos/es/serviciosclimaticos/cambio_climat/datos_diarios/Informe_Escenarios.pdf
- Gil Collado J. (1977). Phlébotomes et leishmanioses en Espagne. In: *Écologie des Leishmanioses*, Montpellier 1974. *Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique*, 239: 177-189.
- Gil-Collado J, Morillas-Márquez F, Sanchís-Marin MC. (1989). Los flebotomos en España. *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, 63: 15-34.
- Githeko AK, Lindsay SW, Confalonieri UE, Patz JA. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 78: 9.
- Goddard J. (2000). Infectious Disease and Arthropods. *Humana Press Inc*, 231.
- Gómez-Saladín E, Doud CW, Maroli M. (2005). Short report: surveillance of *leishmania* sp. Among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction *American Journal. Tropical Medicine Hygiene*, 72: 138–141.
- Gradoni L, Gramiccia M. (2008) Leishmaniosis. En: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Capítulo 2.1.8, 240-250. Editado por Office International des Epizooties.

- Gramiccia M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals epidemiology, diagnostics and antivectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, Sep. 8; 181(1): 23 – 30.
- Gramiccia M, Di Muccio T, Fiorentino E, Scalone A, Bongiorno G, Cappiello S, Paparcone R, Foglia-Manzillo V, Maroli M, Gradoni L, Oliva G. (2010). Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. *Veterinary Parasitology*, 171: 223–228.
- Gramiccia M, Gradoni L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35:1169-1180.
- Gramiccia M, Gradoni L, Pozio E. (1986). Caractérisation biochimique de souches du complexe *Leishmania infantum* isolées en Italie. En: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse* I.M.E.E.E., Montpellier: 445 – 454.
- Griffiths WAD. (1987). Old World Cutaneous Leishmaniasis. En: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine: Volume I. Biology and Epidemiology*. Peters W y Killick-Kendrick, eds. *Academic Press*, 617-636.
- Guernaoui S, Boumezzough A. (2009). Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco. *Journal of Medical Entomology*, 46: 1187-1194.
- Guemaoui S, Pesson B, Boumezzough A, Pichon G. (2005). Distribution of phlebotomine sand flies, of the subgenus *Larroussius*, in Morocco. *Medical Veterinary Entomology*, 19: 111-115.
- Guilvard E, Gállego M, Moreno G, Fisa R, Rispail P, Pratlong F, Martínez-Ortega E, Gállego J, Rioux JA. (1996). Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne). *Parasite*, 3: 191-192.
- Hamel D, Silaghi C, Pfister K. (2013). Arthropod-borne infections in travelled dogs in Europe. *Parasite*, 20:9.
- Hamilton JG. (2008). Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs. *Parasite*, 15 (3): 252-256.

- Hilbe JM. (2007). Negative Binomial Regression. Cambridge University Press, NY, pp.264.
- Hlavacova J, Votypka J, Volf P. (2013). The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand flies. *Journal Medical Entomology*, 50: 955-958.
- Izri A, Depaquit J, Parola P. (2006). Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. *Médecine Tropicale*, 66: 429-435.
- Jarvis A, Reuter HI, Nelson A, Guevara E. (2008). Hole – filled seamless SRTM data V4. *International Centre for Tropical Agriculture (CIAT)*. <http://srtm.csi.cgiar.org/>.
- Jiménez M, González O, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fúster F, Molina R. (2013). Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitology Research*, 112: 2453-2459.
- Joshi S, Rawat K, Yadav NK, Kumar V, Siddiqi MI, Dube A. (2014). Visceral leishmaniasis: advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. *Frontiers in Immunology*, 5: 380
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22: 9.
- Killick-Kendrick R. (1978). Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. *Acta Tropica*, 35: 297-313.
- Killick-Kendrick R. (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17: 279-289.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical Veterinary Entomology*, 11 (2): 105-111.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Leaney AJ, Rioux JA. (1979). Aspects of the life-cycle of *Leishmania* in the sandfly. *En: Proceedings of the Second European Multicolloquium of Parasitology*. Prosveta, Belgrade, Yugoslavia, 89-95.

- Killick-Kendrick R, Ready PD, Pampiglione S. (1977). Notes on the prevalence and host preferences of *Phlebotomus perfiliewi* in Emilia Romana, Italy. *Coloquios Internacionales. CNRS: Ecologie Leishmanioses*: 169 – 175.
- Killick-Kendrick R, Rioux JA, Bailly M, Guy MW, Wilkes TJ, Guy FM, Davidson I, Knechtu R, Ward RD, Guilvard E, Perieres J, Dubois H. (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 Cévennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 59 (6): 555-572.
- Kuhn KG. (1999). Global warming and leishmaniasis in Italy. *Bulletin of Tropical Medicine and International Health*, 7: 1-2.
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. (2002). Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (1): 210-215.
- Lane RP. (1993). Sandflies (Phlebotominae). En: Medical Insects and Arachnids. Lane RP y Crosskey RW, eds. *Chapman and Hall*, 78-119.
- Léger N, Depaquit J. (1999). Les Phlébotomes. En: Les Leishmanioses. *Collection Médecine Tropicale de l'AUPELF-UREF*, 90-108.
- Léger N, Depaquit J. (2002). Systématique et biogéographie des Phlébotomes (Diptera: Psychodidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 38: 163-175.
- Lepe JA, Ubeda JM, Morillas F, Guevara DC, Martín-Sánchez J, Guerrero FJ, Sanchís-Marín MC, Perea R. (2000). Epidemiology of the leishmaniasis in the nature reserve of Sierra de Aracena and Picos de Aroche (Southwest Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, 60 (3-4): 113 – 119)
- Lewis DJ, Ward RD. (1987). Transmission and vectors. En: The Leishmaniasis in Biology and Medicine: Volume I. Biology and Epidemiology. Peters W y Killick-Kendrick, eds. *Academic Press*, 235-262.
- Lladó MT, Rotger MJ. (1990). Estudio del flebotomo como vector de la leishmaniasis en la isla de Mallorca. *Conselleria de Sanitat i Seguretat Social del Govern Balear*. Palma de Mallorca.

- Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Chicharro C, Solano-Gallego L. (2014). Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. *Parasites & Vectors*, 7:120.
- Lucientes-Curdi J, Sánchez-Acedo C, Castillo-Hernandez JA, Estrada Peña A. (1988). Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniosis de Zaragoza. *Revista Ibérica de Parasitología*, 48: 7-8.
- Lucientes J, Castillo JA, Gracia MJ, Peribáñez MA. (2005). Flebotomos, de la biología al control. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 6: 1-8.
- Maia C, Afonso MO, Neto L, Dionísio L, Campino L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *Journal Vector Borne Diseases*, 46: 268–272.
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27: 123-147.
- Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zini E, Zatelli A. (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236, No. 11, 1200-1206.
- Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'Oorazi A, 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. *Medical Veterinary Entomology*, 15 (4): 358-363.
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health*, 13: 256–264.
- Martín-Martín I, Molina R, Jiménez M. (2013). Molecular and Immunogenic Properties of Apyrase SP01B and D7-Related SP04 Recombinant Salivary Proteins of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 14.

- Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Peérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145: 267-273.
- Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Baron S, Diaz V, Morillas-Márquez F. (2009). Canine leishmaniosis in southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 795-798.
- Martín-Sánchez J, Gállego M, Barón S, Castillejo S, Morillas-Márquez F. (2006). Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100: 527-532.
- Martínez-Ortega E. (1985). Los flebotomos ibéricos (Diptera Psycodidae). I Almería. *Annales de Biologie*, 3: 107-111.
- Martínez-Ortega E, Conesa Gallego E. (1987). Fenología de los flebotomos del subgénero *Larrousius* (Dip. Psycodidae, *Phlebotomus*) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín Asociación Española Entomología*, 11: 293-300.
- Martínez-Ortega E, Conesa Gallego E, Díaz-Sánchez F. (1988). Aportación al conocimiento de los flebotomos (Diptera Psycodidae) de las Islas Canarias. *Revista Ibérica Parasitológica*, 48 (1), 89 – 93.
- Masucci M, De Majo M, Contarino RB, Borruto G, Vitale F, Pennisi MG. (2003). Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Veterinary Research Communications*. 27 Suppl 1:771- 774.
- Matas-Mir B, Rovira-Alos J. (1989). Estudio epidemiológico de la leishmaniosis canina en la isla de Mallorca. *Conselleria de Sanitat i Seguretat Social del Govern Balear*, Palma de Mallorca.
- Menn B, Lorentz S, Naucke TJ. (2010). Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasites & Vectors*, 3: 34.
- Mencke N. (2011). The importance of canine leishmaniosis in non-endemic areas, with special emphasis on the situation in Germany. *Berinder undl Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, Nov-Dec; 124 (11-12): 434-442.

- Mencke N, Volf P, Volfova V, Stanneck D. (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitology Research*, 90 (Suppl 3): S108-111.
- Millán J, Zanet S, Gomis M, Trisciuglio A, Negre N, Ferroglio E. (2011). An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerging Diseases*, 58: 352 – 357.
- Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D, Gálvez R. (2012). Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasites & Vectors*, 5: 60.
- Miró G, Gálvez R, Freaille C, Descalzo MA, Molina R. (2011). Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatment. *Parasites & Vectors*, 13: 52.
- Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R. (2007a). Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology*, 143: 375–379.
- Miró G, Molina R. (2006). Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España. *Bayer HealthCare*, 112.
- Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, García S, García A, Caballero MJ, Molina R. (2007b). A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitology Research*, 101: 253-257.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 491- 493
- Molina R, Aransay A, Nieto J, Cañanvate C, Chicharro C, Sans A, Flores M, Cruz I, García E, Cuadrado J, Alvar J. (2005). The Phlebotomine sand flies of Ibiza and Formentera Islands (Spain). *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 82: 12-13.
- Molina R, Espinosa-Góngora C, Gálvez R, Montoya A, Descalzo MA, Jiménez MI, Dado D, Miró G. (2012a) Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary Parasitology*, 6; 187 (3-4): 529-533.

- Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J. (2012b). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 190: 268-271.
- Molyneux DH, Killick-Kendrick R. (1987). Morphology, ultrastructure and life cycles. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine: Volume I. Biology and Epidemiology*. Peters W y Killick-Kendrick, eds. *Academic Press*, 121-176.
- Moore J, Brown K. (2013). Sun, sangria and sandflies: Leishmaniasis in an immunosuppressed patient returning from Spain. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 11, 119e122.
- Morales-Yuste M, Morillas-Márquez F, Díaz-Sáez V, Barón-López S, Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J. (2012). Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios *Parasitology Research*, 111:155–164.
- Moreno G. (1989). Les complexes *Leishmania donovani* et *Leishmania infantum*. Implications taxonomiques, biogéographiques et épidémiologiques. A propos de l'analyse enzymatique de 548 souches de l'Ancien et du Nouveau Monde. Thèse Doctoral, *Université des Sciences et techniques du Languedoc*, Montpellier, Francia, 242.
- Moreno J, Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18: 399-405.
- Moreno G, Rioux JA, Lanotte G, Pratlong F, Serres E. (1986). Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique Individualisation du complexe *Leishmania infantum* Corollaires biogéographiques et phylétiques A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. En: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse I.M.E.E.E.*, Montpellier, 105-117.
- Moreno E, Schwartz J, Fernández C, Sanmartín C, Nguewa P, Irache JM, Espuelas S. (2014). Nanoparticles as multifunctional devives for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 11 (4): 579-597.
- Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J, Acedo-Sanchez C, Pineda JA, Macias J, Sanjuan-Garcia J. (2002). *Leishmania Infantum* (Protozoa, Kinetoplastida):

- transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. *Experimental Parasitology*, 100 (1): 71-74.
- Morillas F, Sánchez Rabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, Sanchiz-Marín MC. (1996). Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitology Research*, 82 (6): 569-70.
 - Morillas-Márquez F, Sanchís Marín MC, Martín Sánchez J, Acedo Sánchez C. (1991). On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera Phlebotomidae) in the province of Almería in southeastern Spain. *Parassitologia*, 33: 437-444.
 - Morosetti G, Bongiorno G, Beran B, Scalone A, Moser J, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M. (2009). Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. *Geospatial Health*, 4:115-127.
 - Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366 (9496): 1561-77.
 - Neghina R, Neghina AM, Merkle C, Marincu I, Moldovan R, Iacobiciu I. (2009). Importation of visceral leishmaniasis in returning Romanian workers from Spain. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 7(1):35-9.
 - Nieto J, Alvar J, Mullen AB, Carter KC, Rodríguez C, San Andrés MI, San Andrés MD, Baillie AJ, González F. (2003). Pharmacokinetics, Toxicities, and Efficacies of Sodium Stibogluconate Formulations after Intravenous Administration in Animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 9, 2781–2787
 - Nzelu CO, Kato H, Pupilampu N, Desewu K, Odoom S, Wilson MD, Sakurai T, Katakura K, Boakye DA. (2014). First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (Diptera:Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 6: e2630.
 - Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Carrillo E, Butaud T, Guegan L, Martin V, Cuisinier AM, McGahie D, Guegan S, Cañavate C, Gradoni L. (2014). A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two

- Leishmania infantum* Transmission Seasons. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 8 (10): e3213.
- Oliva G, Roura X Crotti A, Maroli, M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Veterinary Medical Today*, 236, 11: 1192-1198.
 - Otranto D, Dantas-Torres F. (2013a). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology*, 29, 7: 339-345.
 - Otranto D, Dantas-Torres F, de Caprariis D, Di Paola G, Tarallo VD, Latrofa MS, Lia RP, Annoscia G, Breitshwerdt EB, Cantacessi C, Capelli G, Stanneck D. (2013b). Prevention of canine leishmaniasis in a hyper-endemic area using a combination of 10% Imidacloprid/4.55 Flumethrin. *PlosOne*, 8 (2): e56374.
 - Otranto D, de Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa S, Diniz PP, Mencke N, Maggi RG, Breitschwerdt E, Capelli G, Stanneck D. (2010). Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Veterinary Parasitology*, 172 (3- 4): 323-332.
 - Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D. (2007). Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology*, 144 (3-4): 270-278.
 - Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15; 219 (8):1076-83.
 - Özbek Y, Balcioglu IC, Ölgün MK, Simsek FM, Töz SÖ, Ertabaklar H, Demir S, Alkan MZ. (2011). Spatial distribution of phlebotomine sand flies in the Aydin Mountains and surroundings: the main focus of cutaneous leishmaniasis in western Turkey. *Journal Vector Ecology*, 36: S99–S105.
 - Palatnik-de-Sousa CB. (2012). Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 17, 3: 69.

- Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. (2011). One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10, 4: 197.
- Parrot L, Donatien A, Lestoquard F. (1930). Sur le développement du parasite de la leishmaniose canine viscérale chez *Phlebotomus major* var. *perniciosus* Newstead. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 23: 724-725.
- Pavli A, Maltezou HC. (2010). Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, 14 (12): e1032-9.
- Pesson B, Ready PD, Benabdennbi I, Martín-Sánchez J, Esseghir S, Cadi-Soussi M, Morillas-Marquez F, Ready PD. (2004). Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Medical and Veterinary Entomology*, 18: 25-37.
- Peterson T, Jeffrey Shaw J. (2003). Lutzomyia vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal for Parasitology*, 33: 919–931.
- Picado A, Dash AP, Bhattacharya S, Boelaert M. (2012). Vector control interventions for visceral leishmaniasis elimination initiative in South Asia, 2005-2010. *Indian Journal Medical Research*, 136 (1): 22-31.
- Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle E, Brady OJ, Messina JP, Balard Y, Bastien P, Pratlong F, Brownstein JS, Freifeld C, Mekaru SR, Gething PW, George DB, Myers MF, Reithinger R, Hay SI. (2014). Global Distribution Maps of the Leishmaniases. *eLife*, 3: e02851
- Pires CA. (1984). (Phlebotomus of Portugal. I—Natural infestation of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 and *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania* in the zoonotic focus of Arrábida (Portugal)). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 59: 521-524.
- Pittaluga G. (1925). Etude épidémiologique sur la “Leishmaniose viscérale” en Espagne. Rapport présentée à l’Organisation d’Hygiène de la Société des Nations (8 octobre 1925), Société des Nations 1700 (P) 10/25. Genève.
- Pittaluga G, de Buen S. (1918). Especies españolas del género *Phlebotomus*. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 18: 377-428.

- Poepl W, Herkner H, Tobudic S, Faas A, Auer H, Mooseder G, Burgmann H, Walochnik J. (2012). Seroprevalence and asymptomatic carriage of *Leishmania spp.* In Austria, a non-endemic European country. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19: 572–577.
- Poepl W, Obwaller AG, Weiler M, Burgmann H, Mooseder G, Lorentz S, Rauchenwald F, Aspöck H, Walochnik J, Nauke TJ. (2013). Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country. *Parasitology Research*, 112: 4231-4237.
- Ponte-Sucre A. (2013). Introduction: Leishmaniasis – The Biology of a Parasite. *En: Drug Resistance in Leishmania Parasites*, Eds. Alicia Ponte-Sucre, Emilia Díaz, Maritza Padrón-Nieves. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Escuela Luis Razetti, Instituto de Medicina Experimental, Laboratorio de Fisiología Molecular, Caracas. Venezuela, 1-12.
- Portús M, Gállego M, Riera C, Fisa R, Aisa MJ, Botet J, Carrió J, Castillejo S, Iniesta L, López P, Montoya L, Muñoz C, Serra T, Gállego J. (2007). A review of human and canine leishmaniosis in Catalonia, and associated vector distribution. *Revista Ibérica de Parasitología*, 67 (1-4): 59-67.
- Portús M, Gallego M, Seguí MG, Sole J. (1994). Is leishmaniasis endemic on the island of Minorca (Spain)? A human visceral case after living 13 years in Minorca. *Parasite*, 1: 87-88.
- Portús M, Rioux JA, Gállego J, Lanotte G, Pratlong F, Moreno G. (1986). Les leishmanioses en Catalogne (Espagne). A propos de l'identification enzymatique de neuf souches d'origine humaine et canine. *In: Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. IMEEE, Montpellier: 433 – 438.
- Pujol A, Cortés E, Ranz A, Vela C, Aguiló C, Martí B. (2007). Estudi de seroprevalència de leishmaniosi i d'ehrlichiosi a l'illa de Mallorca. *Revista del Col·legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears Veterinària*, 32: 9-12.
- Quinnell RJ, Courtenay O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136: 1915–1934.
- Real Decreto 2210/1995. Boletín Oficial del Estado. Nº 21/1502. Pág. 2153 – 2158. <https://www.boe.es/boe/dias/1996/01/24/pdfs/A02153-02158.pdf>

- Real Decreto 526/2014. Boletín Oficial del Estado. Nº 167. Sec.1 Pág: 54170 – 54178. <http://www.boe.es/boe/dias/2014/07/10/pdfs/BOE-A-2014-7291.pdf>
- R Development Core Team. R. (2012). A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*, ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/> (último acceso 11.10.14).
- Ranque J, Quilici M, Dunan S. (1975). Les leishmaniose du sud-est de la France. *Ecologie – Epidemiologie – Prophylaxie. Acta Tropica*, 32 (4): 371-380).
- Ready PD. (2008). Leishmaniasis emergence and climate change. *Office International des Epizooties*, 27 (2): 399-412.
- Ready PD. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, 15: 19505.
- Ready PD. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Revision Entomology*, 58: 227-250.
- Ready PD. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6: 147-154.
- Ready PD, 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.
- Real Decreto 526/2014, de 20 de Junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación. Boletín Oficial del Estado Núm 167, 54170-54178.
- Rees PH, Kager PA. (1987). Visceral leishmaniasis and post-Kala-azar dermal leishmaniasis. *En: The Leishmaniasis in Biology and Medicine: Volume I. Biology and Epidemiology*. Peters W y Killick-Kendrick, eds. *Academic Press*, 583-615.
- Riera C, Valladares JE. (1996). Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitology today*, 12: 10.
- Riera C, Valladares JE, Gállego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrió J, Alberola J, Arboix M. (1999). Serological and parasitological follow-up in dogsexperimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumineantimoniate. *Veterinary Parasitology*, 84: 33–47.

- Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portús M. (2004). Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98: 102-110.
- Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jiménez MT, Muncunill J, Sedeño M, Mascaró M, Udina M, Gállego M, Carrió J., Forteza A., Portús M. (2008). Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion*, 48: 1383-1389.
- Rioux JA, Aboulker JP, Lanotte G, Killick–Kendrick R, Martini–Dumas A. (1985). Ecology of leishmaniasis in the south of France. 21. Influence of temperature on the development of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Experimental study. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 60: 221-229.
- Rioux JA, Carron S, Dereure J, Périères J, Zeraia L, Franquet E, Babinot M, Gállego M, Prudhomme J. (2013). Ecology of leishmaniasis in the South of France. 22. Reliability and representativeness of 12 *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) sampling stations in Vallespir (eastern French Pyrenees region). *Parasite*, 20: 34.
- Rioux JA, Golvan YJ. (1969). Épidémiologie des Leishmanioses dans le Sud de la France. Paris: *Monographies de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, 37.
- Rioux JA, Golvan YJ, Croset H, Houin R, Juminer B, Bain O, Tour S. (1967). Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. I. Les Phlébotomes. Echantillonnage. Ethologie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*. 42 (6): 561 – 603.
- Rioux JA, Golvan YJ, Houin R, Croset H, Tour S. (1970). Résultats d'une enquête écologique sur le foyer leishmanien des Cévennes meridionales. *Revue de Médecine*, 18: 1039-1052.
- Rioux JA, Goubert JR, Lanotte G, Roustan J, Marco A. (1980). Un cas de leishmaniose autochtone de la muqueuse nasale. *Les Cahiers d'O.R.L.*, 15: 423 – 425.
- Rioux JA, Guilvard E, Gállego J, Moreno G, Pratlong F, Portús M, Rispaill P, Gállego M, Bastien P. (1986). Intervention simultanée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et

- P. perniciosus* Newstead 1911 dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propós d'une enquête en Catalogne (Espagne). En: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse* I.M.E.E.E., Montpellier, 439-444.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Périères J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 111-125.
 - Rioux JA, Rispaill P, Lanotte G, Lepart J. (1984). Relations Phlébotomes-bioclimat en écologie des leishmanioses. Corollaires épidémiologiques. L'exemple du Maroc. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 131, *Actual Boanique*, 2-4: 549-557.
 - Rivas-Martínez S. (1983). Pisos bioclimáticos de España. En: Lazaroa. Madrid. Spain, 5: 33-43.
 - Romero GAS, Boelaert M. (2010). Control of visceral leishmaniasis in Latin America- A Systematic Review. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 4 (1): e584.
 - Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, Spurck T, Low Choy J, Handman E. (2004). Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *International Journal for Parasitology*, 34: 655-664.
 - Rossi E, Rinaldi L, Musella V, Veneziano V, Carbone S, Gradoni L, Cringoli G, Maroli M. (2007). Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy. *Geospatial Health*, 2: 191-198.
 - 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 Tropica*, 105: 158–165.
 - Rohoušová I, Volf P. (2006). Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitologica*, 53: 161-171.
 - Ruiz de Ybáñez R, del Río L, Martínez-Carrasco C, Segovia M, Cox J, Davies C, Berriatua E. (2009). Questionnaire survey on canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Veterinary Parasitology*, 164: 124 – 133.

- Ryan L, Brazil RP. (1984). *Leishmania* infections in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on the Island of Sao Luis, Maranhao state, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79: 383-384.
- Sabaté D, LlinásJ, HomedesJ, Sust M, Ferrer Ll. (2014). A single-centre, open-label, controlled, randomized clinicaltrial to assess the preventive efficacy of a domperidone-basedtreatment programme against clinical canine leishmaniasisin a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine* 115: 56–63.
- Sacks L. (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cellular Microbiology*, 3: 189-196.
- Saraiva L, Andrade Filho JD, Oliveira Silva S, Ribeiro de Andrade AS, Norma Melo M. (2010). The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105: 1033-1039.
- Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin JC. (2008). Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends in Parasitology*, 24: 135-142.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47 (1): 349–358.
- Seblova V, Sadlova J, Carpenter S, Volf P. (2014). Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*. *Parasites & Vectors*, 7: 222.
- Seguí MG. (1991a). Estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la isla de Menorca. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona, 324pp.
- Seguí MG. (1991b). Estudi epidemiològic de la leishmaniosis a l'illa de Menorca. *Revista de Menorca*, 191: 153-178.
- Seguí MG. (1991c). Estudi epidemiològic de la leishmaniosis a l'illa de Menorca. *Revista de Ciència*, 9: 91-101.
- Seguí MG, Gállego M, Vázquez MT, Portús M. (1989). La leishmaniosis en la isla de Menorca. Estudio preliminar. I Congreso Ibérico de Parasitología, Cáceres, 195.

- Sharma U, Singh S. (2008). Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *Journal Vector Borne Diseases*, 45: 255-272.
- Shaw J. (2007). The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (5): 541-547.
- Sifaki-Pistola D, Ntais P, Christodoulou V, Mazeris A, Antoniou M. (2014). The Use of Spatial Analysis to Estimate the Prevalence of Canine Leishmaniasis in Greece and Cyprus to Predict Its Future Variation and Relate It to Human Disease. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, <http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.13-0459>
- Singh OP, Sundar S. (2014). Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Frontiers in Immunology*, 5: 296.
- Slama D, Haouas N, Remadi L, Mezhoud H, Babba H, Chaker E. (2014). First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasites & Vectors*, 7: 51.
- Slappendel RJ, Teske E. (1999). A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. From *Canine Leishmaniasis: an update* (Ed. R. Killick-Kendrick). *Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona (Sitges)*, 28-31 January, pp 54-59.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 165: 1–18.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramis A, Fernández-Bellón H, Rodríguez A, Ferrer L, Alberola J. (2005). Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 72: 815–818.
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4: 86.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis

- endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal Clinical Microbiology*, 39: 560–563.
- Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro AM, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, Trotta M. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniasis. *Parasit & Vectors*, 21: 5-98.
 - Stockdale L, Newton R. (2013). A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 20; 7 (6): e2278.
 - Suárez Rodríguez B, Isidoro Fernández B, Santos Sanz S, Sierra Moros M.J, Molina Moreno R, Astray Mochales J, Amela Heras C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Revista Española Salud Pública*, 86: 555-564.
 - Tabbabi A, Rhim A, Ghrab J, Martin O, Aoun K, Bouratbine A, Ready PD. (2014). *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi*: a synonym of *Phlebotomus chabaudi* without any proven vectorial role in Tunisia and Algeria. *Medical and Veterinary Entomology*, 28 (Suppl. 1), 51–59.
 - Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI. (2006). Estimating the malaria risk of African mosquito movement by air travel. *Malaria Journal*, 5: 57.
 - Teske E, van Knapen F, Beijer EG, Slappendel RJ. (2002). Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta veterinaria Scandinavica*, 43 (4): 195-201.
 - Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. (1993a) Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 68: 107-108.
 - Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. (1993b). Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 68: 104-106.
 - Tiwary P, Kumar D, Mishra M, Singh RP, Rai M, Sundar S. (2013). Seasonal Variation in the Prevalence of Sand Flies Infected with *Leishmania donovani*. *PlosOne*, 8 (4): e61370.

- Trotta M, Nicetto M, Fogliazza A, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, Solano-Gallego L. (2012). Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. *Ticks Tick Borne Disease*, 3: 294-297.
- Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA, Santos RL. (2014). Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *Journal of infection in developing countries*, 15; 8(4): 403 – 407.
- Van Eys GJJM, Schoone GJ, Kroon Nel CM, Ebeling SB. (1992). Sequence analysis of small ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51: 133–142.
- Velo E, Papparisto A, Bongiorno G, Di Muccio T, Khoury C, Bino S, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M. (2005). Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. *Parasite*, 12: 45-49.
- Volf P, Hostomska J, Rohousova I. (2008). Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite*, 15: 237-243.
- World Health Organization. (2012). Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *WHO Technical Report Series*, 975.
- Xarxa de Vigilància Epidemiològica de les Illes Balears. Informes anuals 2006-2012. Editado por el Govern de les Illes Balears.
- Zariquiey R. (1944). Contribución al conocimiento de la distribución de los *Phlebotomus* de España. *Graellsia*, 2: 15-20.

Páginas Web (último acceso el 15/10/2014)

- <http://www.scalibor.es/leishmaniosis/prevalencia.asp>
- <http://www.gruppoleishmania.org/es/ciclo-biol%C3%B3gico-del-flebotomo-0>
- <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>
- <http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/sandflies/Pages/sandflies.aspx>