



2023

# ESTUDIO INTEGRAL DEL BROTE COMUNITARIO DE LEISHMANIASIS EN LA COMUNIDAD DE MADRID. Una visión completa de 12 años de investigación en el Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis del CNM - ISCIII



**Centro Nacional de Microbiología (CNM)**  
**Instituto de Salud Carlos III**  
**Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades**

Carretera de Pozuelo Km 2, Majadahonda  
28222 MADRID (ESPAÑA)

Publicación incluida en el programa editorial del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Catálogo general de publicaciones oficiales:

<https://cpage.mpr.gob.es/>

Para obtener este informe de forma gratuita en Internet:

<http://hdl.handle.net/20.500.12105/16686>



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Edita: Instituto de Salud Carlos III  
Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades

NIPO pdf: 834230197

NIPO Epub: 834230181

DOI [10.4321/repisalud.16686](https://doi.org/10.4321/repisalud.16686)

Diseño y maquetación: Diseño Gráfico Gallego y Asociados, S. L.

Editores:

Ricardo Molina

Javier Moreno

Cita sugerida:

Moreno, Javier (editor); Molina, Ricardo (editor); *Estudio integral del brote comunitario de leishmaniasis en la Comunidad de Madrid. Una visión completa de 12 años de investigación en el CNM*. Majadahonda (Madrid); Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología: 2023.

# ÍNDICE

Prólogo .....	5
CAPÍTULO 1	
Gestión del brote de leishmaniasis.....	9
CAPÍTULO 2	
Manejo clínico de la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis ganglionar localizada por <i>L. Infantum</i> en España. Un enfoque práctico .....	36
CAPÍTULO 3	
Manejo clínico de la leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucosa por <i>Leishmania Infantum</i> en España .....	68
CAPÍTULO 4	
Diagnóstico de laboratorio de la leishmaniasis.....	88
CAPÍTULO 5	
Infección asintomática en el brote de leishmaniasis del suroeste de Madrid .....	103
CAPÍTULO 6	
Seguimiento de pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos en el contexto del brote comunitario de leishmaniasis en el suroeste de Madrid .....	121
CAPÍTULO 7	
Caracterización molecular de <i>Leishmania</i> .....	135
CAPÍTULO 8	
Reservorios de la Leishmaniasis: nuestra experiencia en la Comunidad de Madrid .....	144
CAPÍTULO 9	
Estudios entomológicos de flebotomos en la Comunidad de Madrid.....	167
CAPÍTULO 10	
Aportaciones del xenodiagnóstico en el contexto del brote de leishmaniasis de Fuenlabrada .....	201
CAPÍTULO 11	
Saliva de los flebotomos: aplicación práctica al estudio del brote.....	227
CAPÍTULO 12	
Nuevas aproximaciones y aplicaciones en el estudio de brotes de leishmaniasis.....	252
Reseñas biográficas de los coordinadores de los capítulos .....	274

## Prólogo

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa parasitaria transmitida por vectores incluida en el grupo de Enfermedades Tropicales Desatendidas de la OMS y que tiene una alta incidencia en la población más pobre de los países en desarrollo de África, Asia y América. De forma paradójica, la leishmaniasis es también una zoonosis endémica en España y otros países europeos de su entorno, en los que cada año se reportan un número no desdeñable de casos humanos. Es cierto que en nuestro país la leishmaniasis es más conocida por afectar a los perros en los que causa leishmaniasis canina, una infección común entre las mascotas de la península y las Islas Baleares. No obstante, a pesar de ser menos frecuente en personas, en los últimos años se ha observado un incremento sostenido del número de casos humanos y se han declarado varios brotes, situación de la que podemos dar cuenta en nuestro laboratorio del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII) que es el Laboratorio Nacional de Referencia para Leishmaniasis Humana y Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis, en el que confirmamos el diagnóstico de buena parte de los casos de leishmaniasis visceral y cutánea que ocurren en España.

La leishmaniasis presenta una alta complejidad ecológica, epidemiológica y clínica, que es consecuencia del alto número de especies de *Leishmania* que la causan, de la diversidad de formas clínicas que presenta, de la variedad de reservorios y vectores implicados en la transmisión del parásito y de los múltiples factores ambientales, sociales, económicos y sanitarios que afectan dicha transmisión. Esta enfermedad es una preocupación creciente de salud pública debido al aumento de su extensión e incidencia en las zonas endémicas. Este aumento es debido a factores como el cambio climático, las transformaciones ambientales, las migraciones masivas o las condiciones de inmunosupresión. En este contexto de cambio global, el brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid, objeto de estudio en este libro, constituye un muy buen ejemplo de la expansión en nuestro país de la leishmaniasis asociada a los cambios ambientales y las actuaciones humanas que finalmente han desembocado en un brote en una zona urbana con un gran número de afectados.

Desde el primer momento el brote de leishmaniasis ha sido extraordinario por lo inesperado, por el alto número de casos reportados, por la implicación directa de reservorios silvestres, por su duración (actualmente sigue abierto, pero con una incidencia mucho menor que en los primeros años), por las altas tasas de infección

observada en los vectores, por las dificultades para el control de los reservorios y vectores, etc... Todos estos aspectos muestran la complejidad de la leishmaniasis y de la multitud de factores que en este caso se han combinado para dar lugar a la «tormenta perfecta» en la que ha resultado este brote de leishmaniasis y cuyas características se describen minuciosamente a lo largo de los diferentes capítulos que componen esta obra.

El objetivo que se pretende conseguir con este libro es mostrar y poner al día el excelente trabajo de investigación sobre el brote realizado a lo largo de los últimos 12 años en el Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis del ISCIII. Para ello hemos contando también con la participación de los clínicos de los hospitales del área, y los epidemiólogos y gestores del brote en las consejerías de la Comunidad de Madrid. Con ellos hemos colaborado estrechamente durante todo este tiempo y han contribuido generosamente a que el libro sea un trabajo de todos.

El aspecto fundamental que queremos destacar es que, a pesar de las circunstancias extraordinarias y novedosas que han rodeado el brote de leishmaniasis, desde el primer momento dispusimos de todas las herramientas necesarias para investigar las diferentes circunstancias y actores implicados en la dinámica de transmisión del parásito. Más allá de las pruebas diagnósticas de leishmaniasis humana que realizamos para el SNS como laboratorio de referencia, con el fin de profundizar en el estudio del brote hemos empleado diferentes aproximaciones metodológicas como técnicas de identificación y caracterización molecular aplicadas a pacientes, parásitos reservorios y vectores, ensayos de inmunidad celular en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos, aislamiento y cultivo de las cepas de *Leishmania*, captura e identificación de los vectores, ensayos de xenodiagnóstico y otras. Toda la metodología utilizada, así como la experiencia para utilizarla, están disponibles en el Centro Colaborador como resultado de más de 35 años de trabajo de investigación en leishmaniasis humana y canina, dentro y fuera de España.

Los Laboratorios de Leishmaniasis y Entomología Médica del Centro Nacional de Microbiología que componen el Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis, tienen una larga trayectoria de investigación en leishmaniasis. Nuestro objetivo ha sido siempre desvelar la complejidad de la infección, entender los factores que la determinan y aplicar ese conocimiento al desarrollo de medidas de control efectivas. Entre las muchas aportaciones realizadas por el centro colaborador cabe destacar los trabajos pioneros sobre la coinfección VIH/*Leishmania*, en la que nuestro laboratorio reportó el primer caso en España. También confirmamos en estos pacientes la alta carga parasitaria en sangre periférica y su capacidad para transmitir parásitos a los flebotomos, para ello fue preciso realizar xenodiagnósticos directos e indirectos, que se pudieron llevar a cabo gracias a las colonias de flebotomos que

se mantienen en el Laboratorio de Entomología Médica. Asimismo, se demostró la alta variabilidad de las cepas aisladas de pacientes coinfectados mediante análisis de isoenzimas y se confirmó el riesgo de transmisión directa de leishmaniasis entre los individuos que comparten jeringuillas. Hemos participado en el desarrollo y validación de múltiples test diagnósticos, serológicos y moleculares, y en numerosos estudios comparativos internacionales realizados en diferentes áreas endémicas para leishmaniasis. Además, hemos llevado a cabo varios proyectos de investigación sobre la respuesta inmune frente al parásito y el desarrollo de vacunas que han servido para identificar biomarcadores de infección, cura, recaída en pacientes de leishmaniasis visceral tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos, y que también han servido para identificar individuos asintomáticos. El laboratorio ha participado en diferentes misiones para la evaluación de brotes de leishmaniasis en Etiopía, Bután, Argentina, Chad, Camerún, Ghana, Panamá, Bolivia, Bangladés y otros países, en las que se ha llevado a cabo la caracterización molecular del parásito y se han realizado encuestas epidemiológicas e investigaciones entomológicas. De igual forma, hemos desarrollado numerosos estudios sobre leishmaniasis canina para hacer una descripción detallada de la historia natural de la infección en el perro y se ha desarrollado un modelo de infección experimental en estos animales que se ha aplicado con éxito al desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis canina. De todo este trabajo de investigación dan cuenta los numerosos artículos científicos publicados a lo largo de los años, que recogen contribuciones fundamentales de nuestro laboratorio y constituyen una referencia mundial para la investigación en leishmaniasis humana y canina. Toda esta experiencia previa ha servido para dar respuestas rápidas y claras a las numerosas interrogantes que ha generado el brote y cuya resolución ha resultado crucial para reducir la transmisión del parásito y controlar el brote. Invitamos al lector a buscar en los diferentes apartados del libro las preguntas e incógnitas que se plantearon en el brote y a disfrutar de las respuestas que se dieron para cada caso.

Por último, indicar que la amplia variedad de recursos utilizados en el laboratorio y en el campo para investigar el brote y también la cercanía que ha facilitado mucho su estudio (el brote se ha producido «al lado de casa»), ha resultado en una producción considerable de datos y publicaciones científicas que lo convierten en uno de los brotes de leishmaniasis mejor estudiados hasta el momento. La experiencia recogida en esta obra ayudará sin duda al estudio y control de futuros brotes de leishmaniasis. No cabe duda que los habrá, dentro y fuera de nuestro país, y aunque es difícil evitar que se produzcan, si podemos prevenir y mitigar sus consecuencias mediante actividades continuadas de vigilancia activa centradas en los diferentes actores que participan en el ciclo de la leishmaniasis: parásito, vectores, reservorios

animales y hospedadores humanos. El objetivo de estas actividades debe ser reducir los efectos que sobre la transmisión del parásito puedan tener los cambios ambientales y las actuaciones humanas que se produzcan en el futuro. El conocimiento y experiencia adquiridos durante estos 12 años puede y debe ayudar a que brotes tan extensos no vuelvan a ocurrir.

**Ricardo Molina y Javier Moreno**

## CAPÍTULO 1

# Gestión del brote de leishmaniasis

**Fernando Fúster, Andrés Iriso**

Área de Vigilancia de Riesgos Ambientales en Salud. Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid.

## INTRODUCCIÓN

A finales del año 2010 los Servicios de Epidemiología de la Comunidad de Madrid detectaron un incremento inusual en el número de casos de leishmaniasis humana en varios municipios del sur de Madrid que afectaba, de forma particular, a Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid.

Desde entonces, se han notificado un total de 796 casos a fecha de mayo de 2022, con más de 150 casos algunos años, siendo el mayor brote de leishmaniasis de la cuenca mediterránea. La curva epidemiológica refleja en los últimos años una disminución importante del número de casos, 15 entre 2020 y 2021.

Desde el momento en que se detectó la concentración de casos de leishmaniasis en Fuenlabrada, la Consejería de Sanidad desarrolló múltiples actuaciones con objeto de acotar el problema y solucionar la situación lo antes posible, teniendo en cuenta que nos enfrentábamos a una enfermedad vectorial compleja, en la que intervienen varios reservorios difíciles de controlar, como luego se pudo comprobar, y un vector con un ciclo biológico especial, en el que las fases inmaduras se desarrollan en el medio terrestre, en áreas dispersas y de difícil acceso, lo que hace muy complicado su control.

A esto se añadía la dimensión espacial del brote, que afectaba a un territorio urbano y periurbano de gran extensión y complejidad.

Las encuestas epidemiológicas que se realizaron inicialmente no encontraron ningún dato significativo o factor asociado que permitiera establecer hipótesis sobre la causa de este incremento tan elevado de casos. El patrón no se parecía al de otros brotes similares de la cuenca mediterránea.

Las actuaciones ambientales de vigilancia y control, incluidos los estudios específicos llevados a cabo en los perros, gatos y flebotomos de la zona afectada, comenzaron a realizarse en 2011, tan pronto se tuvo conocimiento del brote.

Los resultados que se obtuvieron de los estudios de la prevalencia de leishmaniasis en los perros de la zona eran de absoluta normalidad. Tampoco se encontró correlación entre la ubicación de los casos humanos y la localización de las colonias de gatos en los municipios ni valores de prevalencia que pudieran provocar un brote de esta naturaleza.

La investigación de los flebotomos sí arrojó densidades elevadas de *Phlebotomus perniciosus* en varios puntos de los parques de Bosquesur y Polvoranca y en zonas limítrofes al entorno de Fuenlabrada, así como en las zonas residenciales limítrofes con Bosquesur y, en ocasiones, en puntos del interior del casco urbano.

Las primeras conclusiones que se pusieron de manifiesto con esta investigación mostraban que el número de casos humanos era muy elevado, que en la zona había densidades muy elevadas de flebotomos, que el perro no parecía jugar un papel relevante, y que se desconocían los posibles reservorios que justificaran un brote de tal dimensión. A su vez, se comprobó que en la zona geográfica en la que se había originado el brote se habían producido cambios drásticos desde el punto de vista ambiental, como consecuencia del desarrollo urbanístico de los últimos 15 años.

## JUSTIFICACION DEL BROTE

En los años 70 y 80, los municipios de la zona del brote, Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid, eran centros urbanos con poca población y con una economía centrada en la agricultura de secano (cereal), con explotaciones ganaderas de vacuno de leche y ovino y con amplias zonas rurales de pastos.

En este terreno, con gran aprovechamiento del suelo agrícola, había también un elevado número de lepóridos (liebres y conejos), ya que era una zona de caza para estas especies que estaban sometidas a una fuerte presión cinegética y ambiental tanto por la caza y depredadores, como por la siembra y el aprovechamiento de los pastos por los animales de renta.

Por otra parte, la red de carreteras se limitaba a aquellas que comunicaban exclusivamente los municipios entre sí y con la capital.

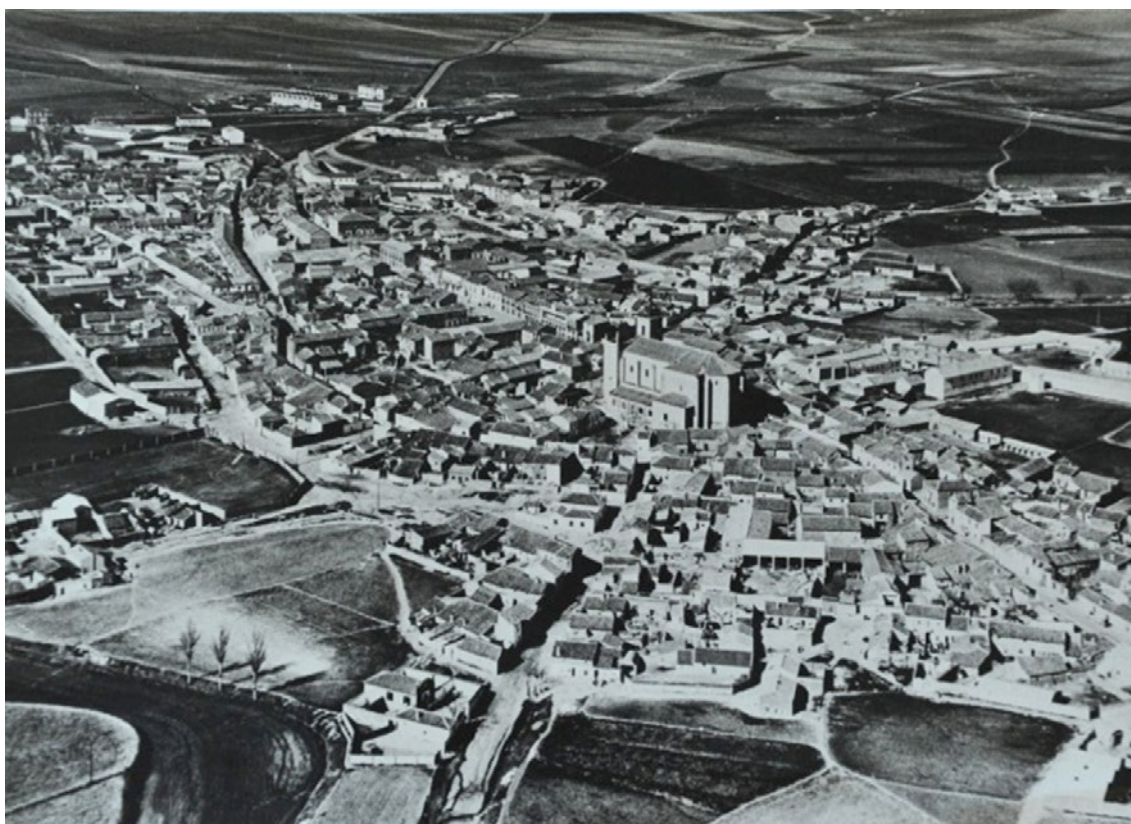
En pocos años se produjo una profunda transformación debido al importante crecimiento demográfico y la urbanización de este espacio, que trajo consigo las siguientes consecuencias:

- De una población, de los cuatro municipios antes mencionados en los años 70, cercana a los 136.000 habitantes, se pasa a una población próxima a los 580.000 habitantes en solo 40 años, lo que provoca una gran expansión del área urbana.

- Las áreas agrícolas de secano y la ganadería existente en los terrenos rurales se sustituyen, en gran medida, por nuevas áreas urbanas residenciales, polígonos industriales y una gran red de autovías y carreteras.
- La construcción de grandes infraestructuras de comunicación, como el tren de cercanías y las autovías antes mencionadas, lleva asociada la formación de taludes, que facilitan el crecimiento de las poblaciones de conejos, que los emplean como lugares de cría.
- La creación de nuevas zonas verdes (parques forestales periurbanos), como Bosquesur o Polvoranca, para dar respuesta a las nuevas demandas urbanas de recreo y esparcimiento, favoreció la aparición de una gran población de liebres que encontró un terreno idóneo para su crecimiento, sin apenas predadores o competidores ni actividad cinegética.

En las [figuras 1](#) y [2](#) se puede apreciar la intensa transformación sufrida en estos municipios y, en concreto en el de Fuenlabrada y Leganés, entre los años 60 y 90.

**Figura 1. Fuenlabrada en los años 60.**

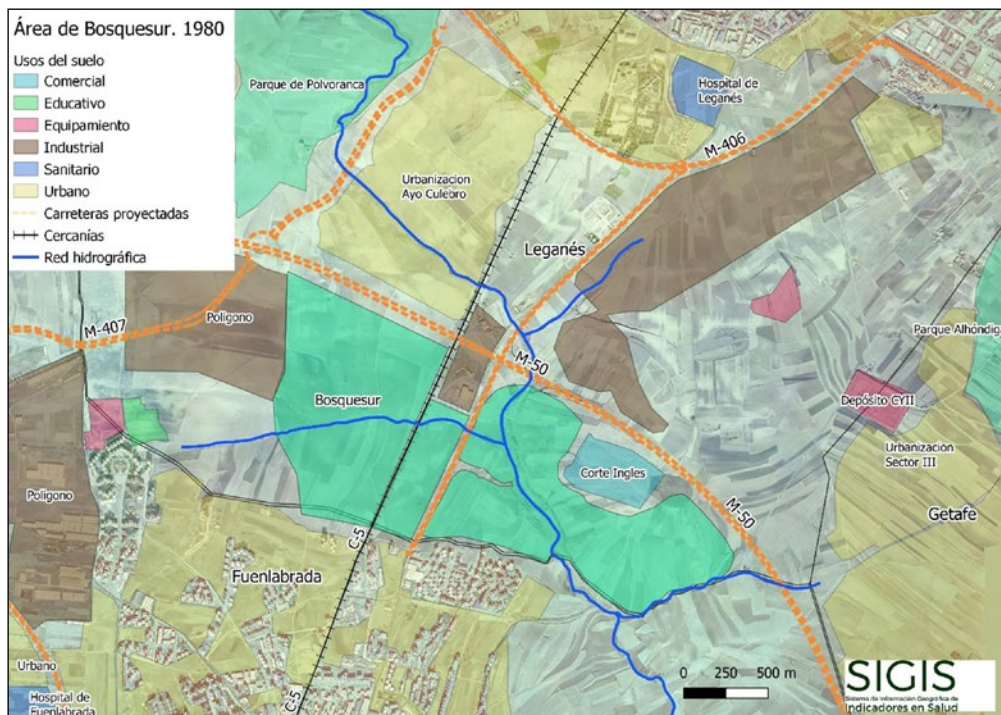


**Figura 2. Fuenlabrada en los años 90.**

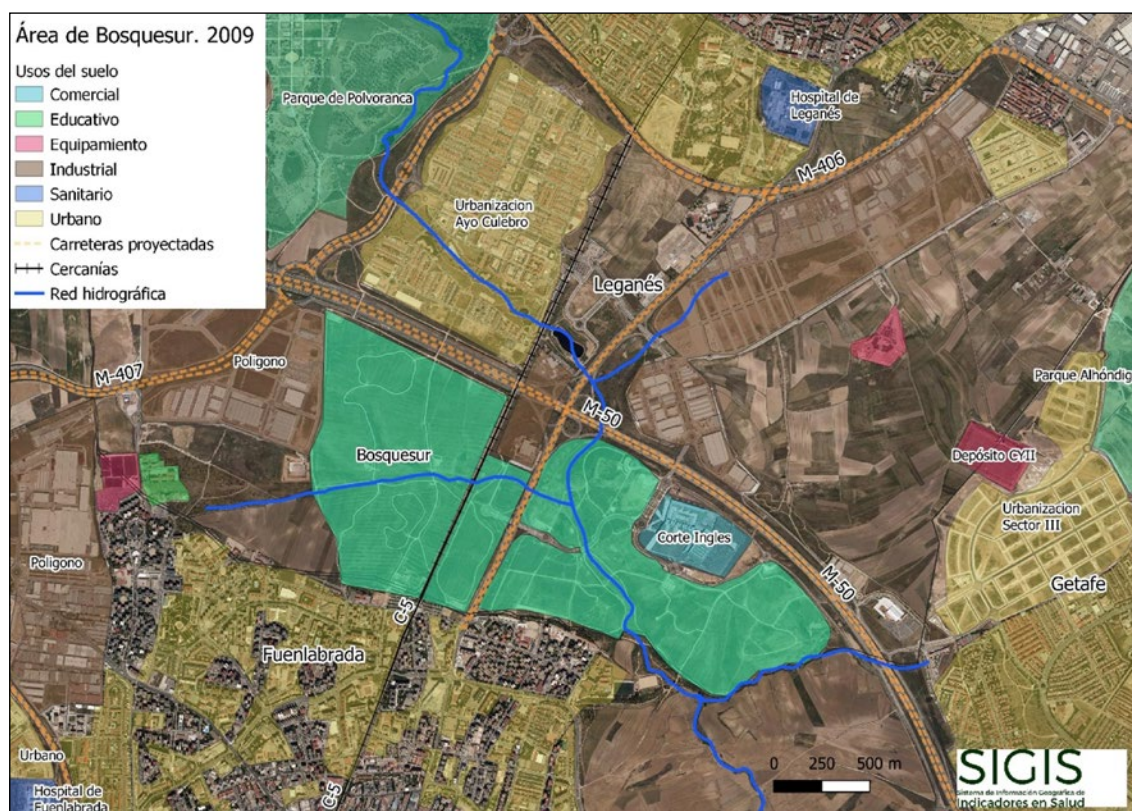


Por otra parte, en las [figuras 3 y 4](#) se pueden observar los cambios acaecidos en los diferentes usos del suelo en el área cercana a Bosquesur entre 1980 y 2009.

**Figura 3. Usos del suelo en el área de Bosquesur 1980.**



**Figura 4. Usos del suelo en el área de Bosquesur 2009.**



En 2011 se solicitó el apoyo y asesoramiento del Instituto de Salud Carlos III y se comenzaron los primeros estudios en los perros del área para conocer si estaban implicados en el brote. Los valores de prevalencia encontrados, inferiores incluso a los valores que se obtenían en el sistema de vigilancia de la leishmaniasis en perros de la Comunidad de Madrid, descartaba que estuvieran jugando un papel relevante, por lo que se comenzó a sospechar de otros posibles reservorios y en concreto de las liebres, dada su gran densidad en la zona y su cercanía a la población.

Las investigaciones realizadas confirmaron, finalmente, la participación activa de la liebre, como principal reservorio, al comprobarse su gran capacidad de transmisión del parásito al flebotomo, vector de la enfermedad, y la elevada prevalencia del parásito en sus poblaciones, sin descartar otros posibles reservorios.

En todo momento se trabajó de forma estrecha con las autoridades de Medio Ambiente, que se ocuparon de las capturas de las liebres y de las actuaciones de control ambiental de la zona, junto con los ayuntamientos. En marzo de 2012 se declaró comarca de emergencia cinegética temporal a los términos municipales de Alcorcón, Fuenlabrada, Getafe, Leganés y Móstoles (*Resolución de 29 de marzo de 2012, de la Dirección General de Medio Ambiente*).

La justificación del brote se puede entender por los siguientes hechos:

- Intensos cambios urbanísticos derivados del crecimiento demográfico y del desarrollo de las infraestructuras de transporte.
- Desaparición de la agricultura y ganadería y de los usos tradicionales del suelo.
- Creación de parques forestales interurbanos con pasto y arbustos que facilitan la vida y la reproducción de lepóridos (liebres y conejos).
- Ausencia de depredadores, competidores y de la caza en estas zonas cercanas a las áreas habitadas de Fuenlabrada y de Leganés en el entorno de Bosquesur.
- Aparición de nuevos hábitats, como las redes de pluviales, las tajeas y los vivares, entre otros, que facilitan la reproducción del vector.
- Cercanía de los reservorios y del vector a la población, muy evidente en el caso de las viviendas de Fuenlabrada y Leganés que limitan con Bosquesur.

Todas estas circunstancias permitieron la amplificación del parásito en un ciclo selvático, del que hasta entonces no se tenía conocimiento, en el que participaban flebotomos y lepóridos, que finalmente afectó a la población de los municipios cercanos.

## **COORDINACION INSTITUCIONAL Y CIENTIFICA**

### **Coordinación con organismos e instituciones**

La coordinación ha sido uno de los aspectos más complejos en la gestión del brote. En este sentido, destaca la constitución de un comité de gestión permanente coordinado por salud pública, en concreto por la Subdirección General competente en sanidad ambiental, en el que participaban las Subdirecciones responsables de epidemiología y de prevención y promoción de la salud, además de los Servicios de Salud Pública de las Áreas IX y X.

En este comité también participaban los Ayuntamientos de Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid, fundamentalmente a través de sus concejales y técnicos de salud y medio ambiente. No hay que olvidar que los ayuntamientos tienen la competencia en la ejecución de las medidas de control en su ámbito municipal.

La Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio (en la actualidad de Medio Ambiente, Vivienda y Agricultura), jugaba también un papel determinante en este comité de gestión, dado que ellos coordinaban todas las actuaciones de control ambiental, tanto las realizadas directamente en los parques con titularidad de la Comunidad de Madrid, como las llevadas a cabo por

los ayuntamientos. Eran dos las subdirecciones sobre las que recaían las actuaciones, la de Recursos Agrarios (ahora de Producción Agroalimentaria) y la de Gestión y Ordenación de Espacios Protegidos (ahora de Espacios Protegidos).

Este comité se reunía de forma periódica en los Centros de Salud Pública de los municipios afectados, con el objetivo de compartir información, plantear estrategias de actuación y llevar a cabo el seguimiento del brote.

Además de este comité de gestión, fueron muchos los organismos o instituciones con los que hubo que coordinarse por diferentes motivos ligados a la gestión del brote. Entre estos podemos citar.

- Centros de Protección Animal colaboradores: 17 centros.
- Granjas escuelas colaboradoras.
- Asociaciones y federaciones de cazadores.
- SEPRONA (Servicio de Protección de la Naturaleza).
- Canal de Isabel II.
- Dirección General de Carreteras de la Comunidad de Madrid.
- ADIF (Administrador de Infraestructuras Ferroviarias).
- Ministerio de Fomento.
- Confederación Hidrográfica del Tajo.
- Universidad Rey Juan Carlos.

### Equipo científico

Como antes hemos mencionado, ante la complejidad del brote y su difícil gestión y abordaje, las autoridades de salud pública de la Comunidad de Madrid, asumieron la gestión del brote, buscando desde el inicio el imprescindible asesoramiento y las recomendaciones de los científicos. Desde la Subdirección General de Sanidad Ambiental se contactó con los principales expertos a nivel nacional en la materia para definir el enfoque del proyecto, apoyar técnicamente la investigación y las actuaciones a realizar.

De este modo se constituyó el comité científico compuesto por:

- Dirección General de Salud Pública.
- Instituto de Salud Carlos III (centro de referencia y colaborador de la OMS para leishmaniasis). Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas y Unidad de Entomología Médica.

- Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Cátedra de Entomología del Departamento de Zoología y Antropología Física.
- Centro de Vigilancia Sanitaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISAVET). Nivel de bioseguridad P3.
- Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Departamento de Patología Animal.
- Dirección General de Medio Ambiente (ahora de Biodiversidad y Recursos Naturales) y la de Agricultura y Ganadería (ahora de Agricultura, Ganadería y Alimentación).
- Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid.
- Centro Coordinador de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES) del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (ahora Sanidad).

## **PROGRAMA DE VIGILANCIA Y CONTROL**

En la definición y puesta en marcha del complejo programa de vigilancia y control, se tuvieron inicialmente en cuenta algunos aspectos como:

- Fuentes de información con las que se contaba, en todos los ámbitos.
- Interlocutores internos: epidemiología, Servicios de Salud Pública de Áreas, promoción de salud, etc.
- Interlocutores externos (medio ambiente, ayuntamientos, laboratorios, empresas colaboradoras, organismos públicos, instituciones, etc.).
- Un responsable/coordinador del programa.
- Recursos científicos en las universidades colaboradoras.

Partiendo de esa base se elaboró un programa consensuado en el que se establecieron los tiempos y los recursos humanos, técnicos y económicos necesarios, y se identificaron responsables en los diferentes niveles de actuación.

Hay que destacar que desde la Sección de Zoonosis y Riesgos Biológicos de la Dirección General de Salud Pública se contaba con mucha experiencia en materia de vigilancia de la leishmaniasis, ya que se disponía de un sistema de vigilancia en perros desde 1996 y de flebotomos, gatos y fauna silvestre, desde 2008, lo que facilitó la puesta en marcha del programa.

Fue muy importante el apoyo de los responsables de la Dirección General de Salud Pública en la aprobación de este programa, que era objeto de seguimiento, evaluación y comunicación continua.

Desde el primer momento se llevaron a cabo acciones que se pueden agrupar en dos grandes bloques: vigilancia (epidemiológica, de reservorios y flebotomos) e intervención (control ambiental y comunicación).

## Vigilancia

### Vigilancia epidemiológica

En la Comunidad de Madrid la leishmaniasis se vigila desde 1997, a través del sistema de notificación de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO). Desde su inclusión como EDO, se venían notificando en la Comunidad de Madrid entre 12 y 25 casos anuales, aunque existía infranotificación, en particular, de los casos de leishmaniasis cutánea. Durante el último trimestre de 2010 se detectó un aumento de casos notificados con respecto a años anteriores.

Tras la detección del aumento inusual de casos se reforzó la coordinación con Atención Primaria y Especializada, se hizo una búsqueda retrospectiva de casos y se profundizó en la investigación epidemiológica de las personas enfermas.

El análisis de los aspectos epidemiológicos del brote se desarrolla con detalle en un capítulo de este libro.

### *Evolución del brote*

Desde 2009 hasta 2022 se han notificado 796 casos humanos de leishmaniasis. Los años 2011 y 2012 fueron el periodo con más casos, con un total de 367. A partir de esa fecha fueron descendiendo paulatinamente. En los dos últimos años completos, 2020 y 2021, se han notificado 15 casos, y en 2022, hasta la fecha, un caso.

En el análisis de la curva epidemiológica de los casos humanos hay que destacar el descenso del número de casos que se produjo en la temporada epidemiológica (julio 2012 a junio 2013), donde se registraron 94 casos, frente a los 206 de la temporada anterior. Se considera que esta reducción tan importante se debió fundamentalmente a las capturas de liebres en los parques de Bosquesur y Polvoranca, en total 1.125 ejemplares mediante la colocación de redes y la participación de galgos y aves de cetrería. Este hecho corroboraba el papel que estaban desempeñando las liebres en este brote.

La evolución del brote es favorable, no obstante, los resultados que se obtienen en los niveles de infección del vector y las liebres y conejos obliga a seguir manteniendo la vigilancia y las actuaciones de control.

## Vigilancia de reservorios

### Animales de compañía

La vigilancia serológica en animales de compañía (perros y gatos), que ya se venía realizando en los Centros de Protección Animal, en el marco del sistema de vigilancia de perros susceptibles de adopción y vagabundos y en el de gatos susceptibles de adopción, se amplió a la vigilancia en perros que acuden a la campaña de vacunación antirrábica y de perros en focos potenciales de riesgo; así como a residencias de animales de compañía, rehalas y explotaciones ganaderas. Todo ello con la idea de conocer el papel que podía estar jugando el perro como reservorio de la enfermedad.

A su vez, los Ayuntamientos llevaron a cabo la recogida de animales abandonados. Sólo en Leganés se recogieron, entre 2010 y 2014, un total de 1.325 perros y 890 gatos abandonados.

También se impulsó la colaboración con los veterinarios clínicos, a fin de llevar a cabo el seguimiento de la enfermedad en los perros que asisten a estas clínicas. En 2012 se puso en marcha un Sistema de Vigilancia de Leishmaniasis en Clínicas Veterinarias Centinela de la zona, en el que no se detectó un incremento de los casos diagnosticados.

El cribado de leishmaniasis que se realizó a los perros de Fuenlabrada y Leganés, aprovechando las campañas de vacunación antirrábica en 2011 y 2012, arrojó unos resultados de prevalencia de un 1% (8 muestras positivas de 811) en 2011 y de un 1,6% (9 positivas de 561) en 2012.

Los resultados de los análisis realizados a perros de riesgo (rehalas, residencias y explotaciones ganaderas) entre 2011 y 2014 indicaron una prevalencia del 2,3% (30 positivos de 1.320).

Estos bajos valores de prevalencia encontrados se podían explicar, quizás, por la existencia de un alto nivel de protección frente al vector en los perros de la zona del brote, bien porque la mayor parte pasa las noches en espacios cerrados, bien por el uso de productos repelentes, collares y pipetas, que les mantienen protegidos.

Además del análisis espacial de las colonias de gatos antes mencionado, a partir de 2011, se comenzaron a analizar muestras de gatos mediante PCR, obteniendo prevalencias similares a las obtenidas en años anteriores en el sistema de vigilancia implantado desde 2008 en la Comunidad de Madrid. Aunque el gato podía tener cierta implicación en la transmisión, no permitía explicar el elevado número de casos humanos encontrado.

En el caso del perro, ni los resultados obtenidos en la vigilancia habitual que se venía realizando en los Centros de Protección Animal de la zona del brote, que eran algo inferiores a los del resto de la Comunidad de Madrid, ni los de campaña antirrábica y de perros de riesgo, apoyaban la hipótesis de hallarnos ante un ciclo convencional de transmisión de la enfermedad.

### Fauna silvestre

En cuanto a la vigilancia de la fauna silvestre, lo más relevante fueron los ensayos de xenodiagnóstico llevados a cabo desde el Instituto de Salud Carlos III, entre diciembre de 2011 y enero de 2012, sobre 7 liebres (*Lepus granatensis*) capturadas en la zona afectada, positivas por serología. A estas se les expuso a la picadura de 100 hembras de *P. perniciosus*. De las 7 liebres estudiadas en las dos sesiones 4 fueron capaces de transmitir el parásito a ejemplares de flebotomos, en concreto 15 de los 293 *P. perniciosus* (5,1%) fueron positivos a *Leishmania infantum*, demostrando así la capacidad infectiva de las liebres.

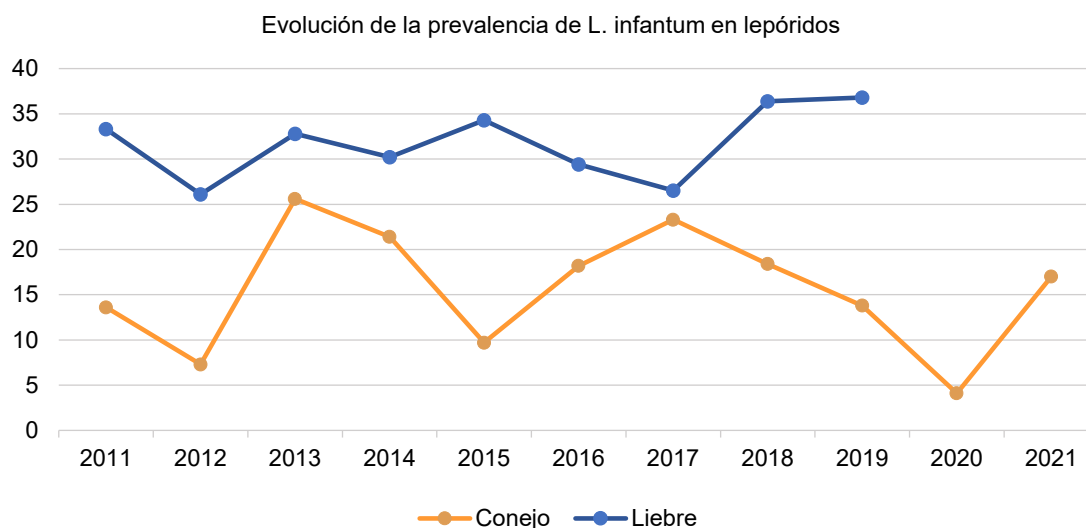
En marzo y octubre de 2013 se llevaron a cabo, de forma similar al caso anterior, ensayos de xenodiagnóstico en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) capturados en la zona del brote, con el fin de conocer la capacidad de esta especie para transmitir el parásito a *P. perniciosus* y determinar su papel como reservorios de la leishmaniasis. El resultado mostró que el conejo también era capaz de transmitir el parásito al vector (flebotomo), aunque en proporción inferior, si lo comparamos con los datos de las liebres de la zona; sin embargo, al ser su carga ganadera muy superior, suponían un elevado riesgo.

Existe un capítulo específico en este libro en el que se trata el xenodiagnóstico.

La vigilancia en fauna silvestre ([Figura 5](#)) se puso en marcha en 2011, llevándose a cabo, con la colaboración del Instituto de Salud Carlos III, el análisis de muestras biológicas de liebres y conejos procedentes de la zona, mediante PCR específico para la detección de DNA de *Leishmania* sp.

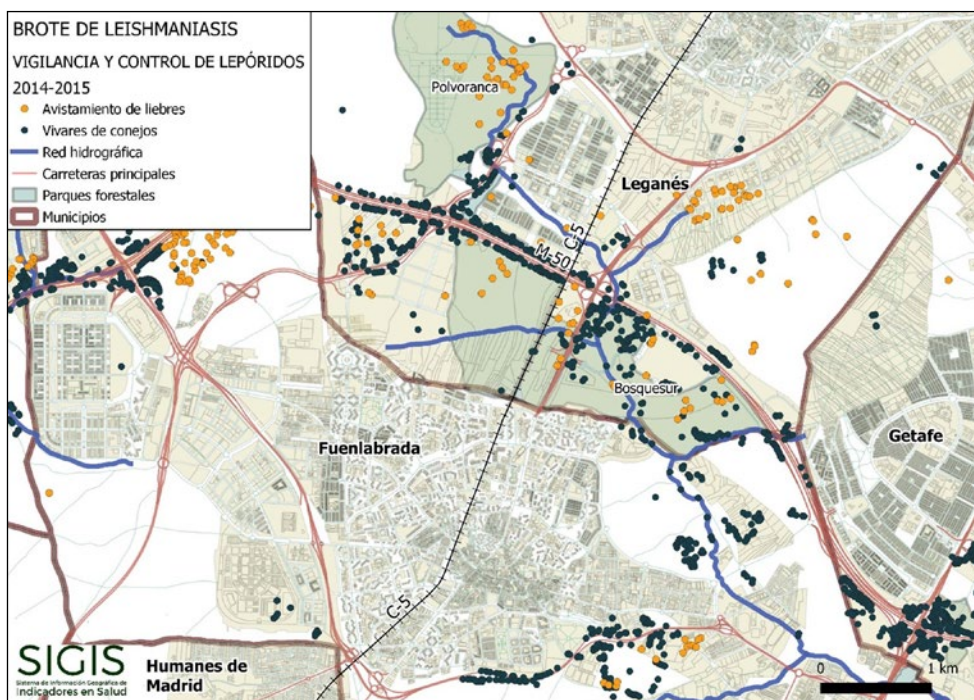
La evolución de la prevalencia de *Leishmania infantum* en el reservorio silvestre ([Gráfico 1](#)), muestra el importante papel de los lepóridos en el brote. Se mantienen porcentajes elevados de animales parasitados, cercanos al 30% en liebres y al 18% en conejos, en concreto 30,7% (200/651) en liebres y 17,6 % (381/2167) en conejos.

**Gráfico 1. Prevalencia reservorios silvestres (PCR) 2011-2021.**



Se realizó un intenso trabajo de campo para conocer la localización de las poblaciones de liebres y conejos ([Figura 5](#)), que permitió dirigir las actuaciones de vigilancia y control.

**Figura 5. Vigilancia de lepóridos: liebres y conejos.**



En el caso de la liebre se localizaron varias zonas en las que se concentraban poblaciones significativas y que fueron objeto de actuaciones específicas. En el caso de los conejos se actuó preferentemente en las áreas más cercanas a los espacios habitados, a fin de reducir el contacto de este reservorio con la población.

En estas actuaciones de eliminación se tuvo en cuenta, además, la transmisión vertical del parásito, que se puso de manifiesto en los análisis realizados durante los años 2013 y 2014 en gazapos que no habían tenido contacto con el vector. Las prevalencias de *Leishmania* observadas en estos gazapos no diferían de forma estadísticamente significativa de las de los adultos (datos pendientes de publicación). Las elevadas prevalencias del parásito que se mantienen en las liebres a lo largo de los años, nos hacen postular un mecanismo similar para las liebres. El mecanismo por el que se produce esta transmisión vertical se desconoce.

Se realizó también análisis mediante PCR a un número pequeño de ejemplares de rata gris (*Rattus norvegicus*) en el que se obtuvieron resultados negativos a *L. infantum*. Estos análisis se han reiniciado en 2020 con la colaboración del ayuntamiento de Leganés, obteniendo en esta ocasión resultados positivos a *Leishmania*.

A partir de 2014 se fueron ampliando los análisis de leishmaniasis a otros animales como rumiantes, carnívoros y finalmente quirópteros, dentro del sistema de vigilancia de fauna silvestre, en el que se hace seguimiento de otras zoonosis, aunque los resultados hasta la fecha no permiten identificar otros posibles reservorios.

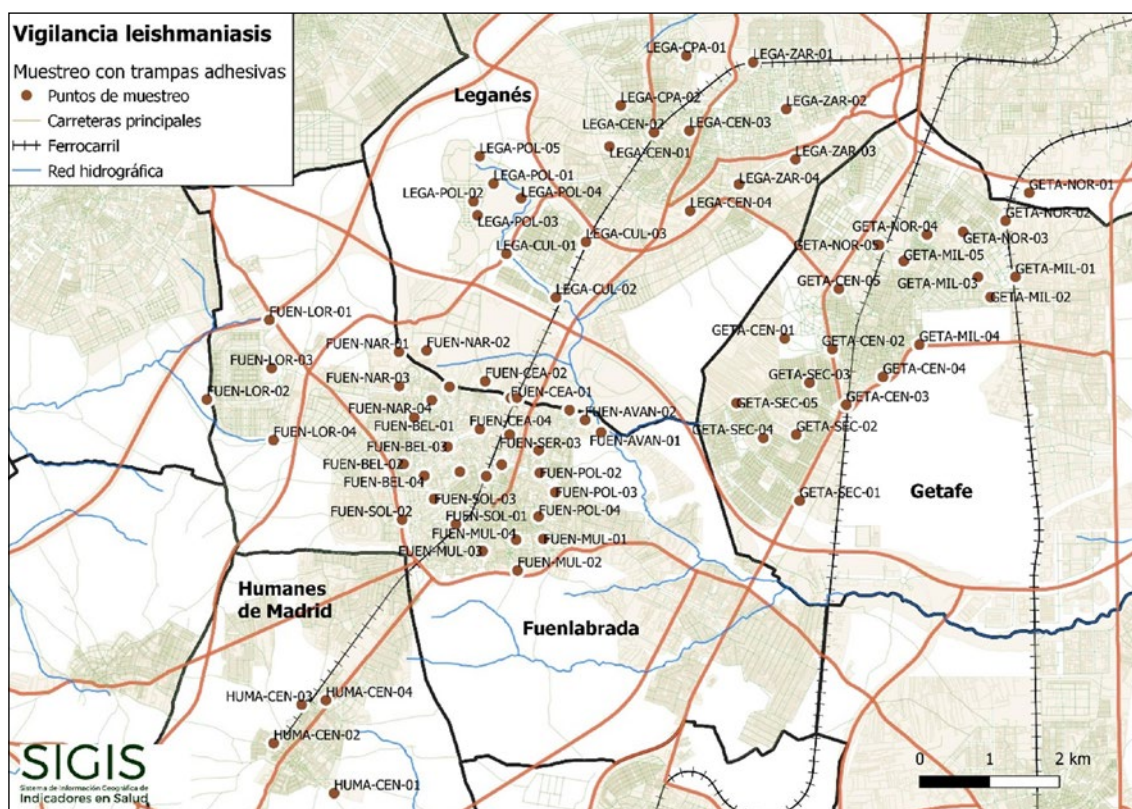
## Vigilancia de flebotomos

### Trampas adhesivas

En enero de 2011 se desarrolló un plan de vigilancia del vector en la zona del brote mediante la colocación y análisis de trampas adhesivas ([Figura 6](#)) y de luz, comprobándose que *P. perniciosus* era el vector transmisor de la enfermedad.

En 2011 se monitorizaron de abril a octubre, época de actividad del flebotomo, 37 estaciones (puntos de muestreo) y se colocaron 222 trampas. En años posteriores se redimensionó y optimizó el alcance del sistema de vigilancia, conservando las estaciones y trampas más representativas. Desde 2011 hasta 2016 se han colocado 737 trampas adhesivas, identificándose más de 125.000 flebotomos. El porcentaje de *P. perniciosus* detectado está en torno al 60%, siendo el resto *Sergentomyia minuta*, que no se considera relevante para la transmisión de *L. infantum*, detectándose en ocasiones ejemplares aislados de *Phlebotomus sergenti* y *Phlebotomus papatasi* pero no de *Phlebotomus ariasi* ni de *Phlebotomus langeroni*.

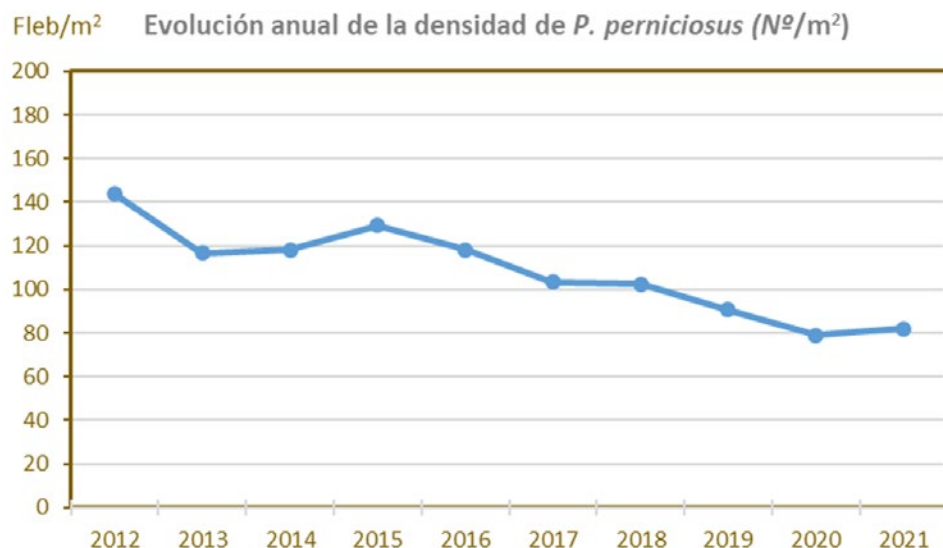
**Figura 6. Vigilancia de flebotomos mediante trampas adhesivas.**



La densidad de flebotomos, medida por la relación entre el número de individuos *P. perniciosus* y la superficie de muestreo, observada en 2011 superó ampliamente los 100 flebotomos/m<sup>2</sup>, valor superior a la media obtenida en la red de vigilancia existente en nuestra región, que se encuentra en torno a los 30-50 flebotomos/m<sup>2</sup>. Es preciso tener en consideración que densidades superiores a 50 flebotomos/m<sup>2</sup> se consideran capaces de mantener el ciclo de infección (Martínez Ortega 1991).

De 2012 a 2021 la densidad media estimada en la zona del brote (Gráfico 2) se ha mantenido por encima de 100 flebotomos/m<sup>2</sup> hasta el año 2019.

**Gráfico 2. Densidad media de flebotomos 2012-2021.**



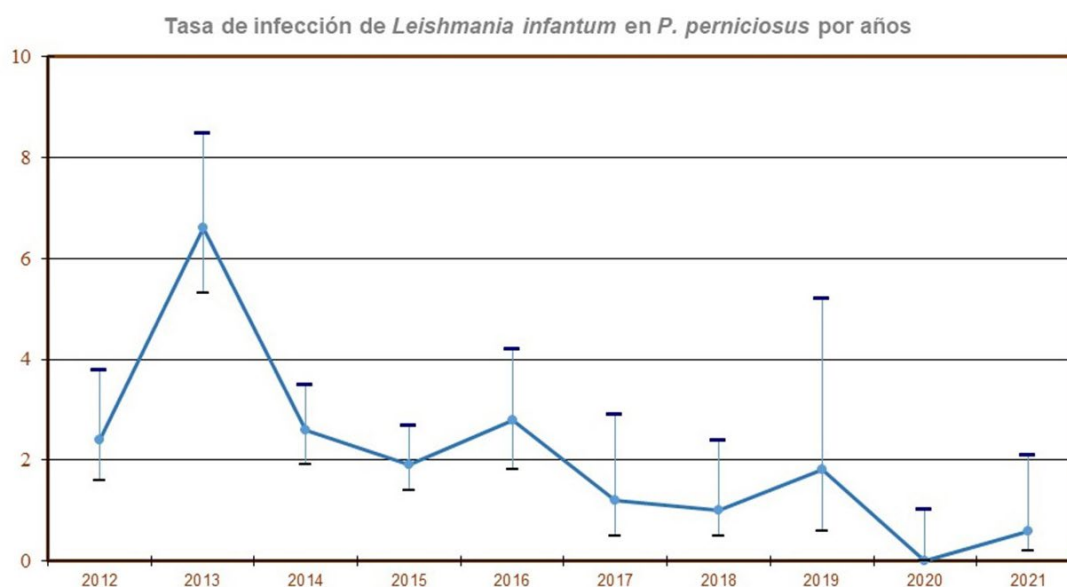
Como parte de la vigilancia del vector, desde la Sección de Zoonosis y Riesgos Biológicos, se realizan desde 2012 estudios de detalle en diferentes zonas del área afectada para mejorar el conocimiento de la presencia del vector y orientar las actuaciones de control. Se han seleccionado, entre otros, colegios e institutos de la zona, lugares donde el flebotomo ha encontrado un entorno adecuado para desarrollarse, encontrándose en estas áreas densidades elevadas en el interior del casco urbano.

### Trampas de luz

Por otra parte, se llevan a cabo estudio de los flebotomos capturados con trampas de luz para la visualización de *Leishmania* sp. mediante microscopía óptica con el fin de conocer cuántos están infectados.

Los datos resumen del muestreo de 2012 a 2021 son los siguientes ([Gráfico 3](#)):

**Gráfico 3. Tasas de infectividad de flebotomos 2012-2021 (muestreo en 4 puntos).**



Se puede observar un máximo en 2013 (6,6%) y ya en 2020 y 2021 un descenso muy significativo de flebotomos positivos.

A su vez, desde 2011, se lleva a cabo el estudio molecular, mediante PCR, de las hembras de flebotomos capturadas con sangre en sus estómagos, en cuatro puntos de la zona del brote, para conocer sus hábitos alimentarios.

De un total de 390 muestras analizadas, el 23,3% de las sangres era de liebres, el 69,5% de conejos, el 4,6% de gatos, el 2% de humanos, el 0,3% de perros y el 0,3% de otras especies.

Es decir, el 92,8% (362/390) de las sangres proceden de liebres y conejos, y sólo el 7,2% (28/390) de otras especies. Este hecho corrobora el papel tan relevante que han desempeñado los reservorios silvestres en el brote, sin descartar otros, como el perro y el gato, con un papel secundario.

## Intervención

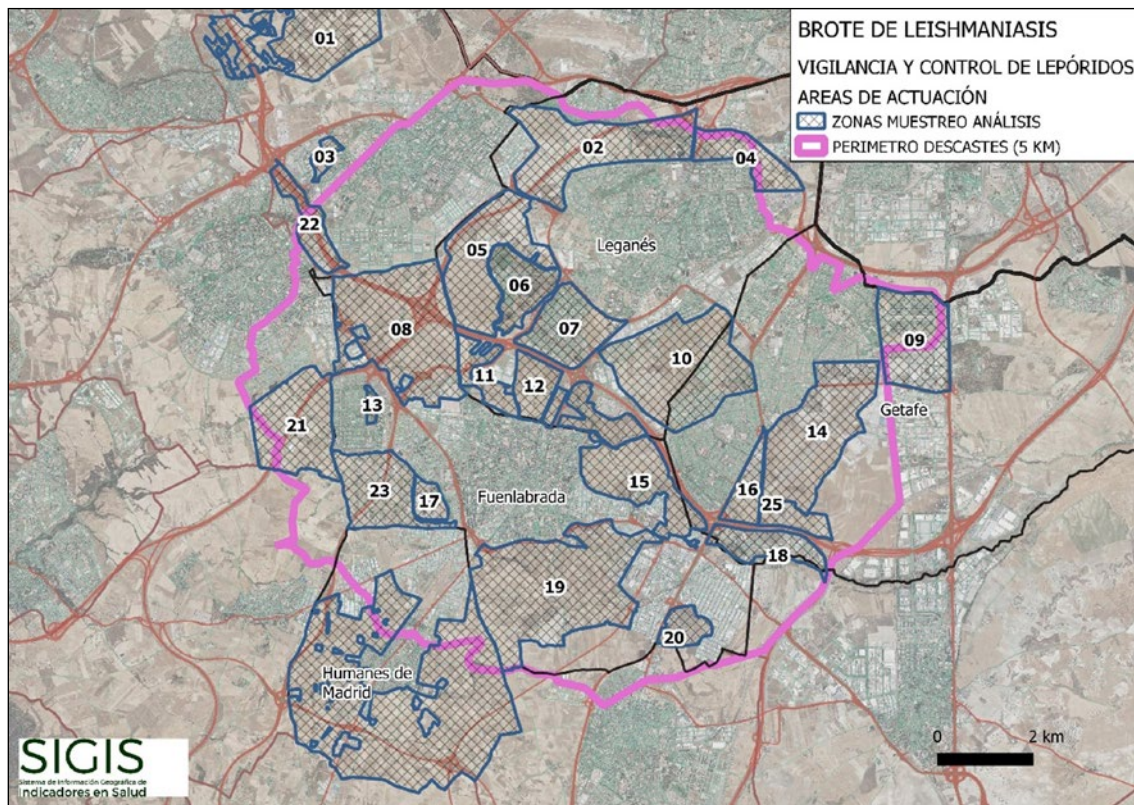
### Control ambiental

El plan de medidas de control ambiental recae fundamentalmente en los ayuntamientos y en las autoridades de medio ambiente de la Comunidad de Madrid y se centra en tres líneas de actuación.

### Control de reservorio silvestre y doméstico

Debido a la gran densidad de lepóridos observada, se puso en marcha un plan de control de poblaciones de liebres y conejos para disminuir la densidad de estas especies. Se llevó a cabo la retirada de la mayor parte de las liebres y conejos que habitaban los parques y terrenos rurales colindantes con las zonas urbanas y otras zonas de Alcorcón, Fuenlabrada, Getafe, Leganés y Móstoles, en un radio de 5 km desde el centro del foco en Bosquesur (Figura 7), priorizando las áreas más cercanas a los espacios habitados.

**Figura 7. Zonas de muestreo para el análisis de leishmania en lepóridos.**



Otra medida fundamental ha sido la eliminación de los vivares de conejos, que además de dificultar la recuperación de sus poblaciones, disminuye la densidad del vector, ya que son un hábitat idóneo para la multiplicación del flebotomo. Se priorizó la eliminación de los vivares de conejos, tanto activos como inactivos, existentes en un área de al menos 500 metros alrededor del límite del casco urbano.

Estas dos medidas se han demostrado como las más eficaces para el control del brote.

En la actualidad se continúa con la captura de lepóridos y con la eliminación de vivares.

También se llevó a cabo un plan de control de las colonias urbanas de gatos asilvestrados, de forma coordinada con las autoridades competentes en la recogida de animales vagabundos (ayuntamientos). Se continúa estudiando su posible implicación como reservorio, aunque su papel no se tiene todavía muy claro. Sería muy útil estudiar mediante xenodiagnóstico su posible implicación en la transmisión, dados los valores de prevalencia de *Leishmania* sp. que se detectan mediante PCR.

### *Control del vector*

Para el control del vector se han llevado a cabo actuaciones medioambientales de modificación del hábitat, tanto de carácter general (desbrozado, eliminación de vegetación, etc.) como específicas, en puntos identificados como lugares de cría y refugio del vector.

Otra de las medidas fue el empleo de cajas nido para aves insectívoras en algunos parques y de quirópteros.

Asimismo, se ha ejecutado un programa de control antivectorial a través de empresas especializadas, que incluía la desinsectación periódica de zonas de riesgo.

Se han utilizado insecticidas piretroides en aplicaciones de choque por nebulización y productos con más residualidad (polvos mojables) mediante pulverización.

Con el fin de buscar una mayor eficacia en los tratamientos insecticidas, se han realizado diferentes ensayos testando varios productos como pinturas insecticidas, así como insecticidas con cebos atrayentes azucarados, no obteniendo resultados concluyentes.

Para disminuir las densidades del flebotomo en zonas donde se detectaron poblaciones muy elevadas, como por ejemplo en el Parque Polvoranca, se llevó a cabo el cerramiento de la red de pluviales (imbornales y registros), obteniendo buenos resultados.

Estas medidas de control precisan un conocimiento, lo más exacto posible, del comportamiento del vector en la zona, su capacidad de desplazamiento y la búsqueda activa de puntos de cría y refugio mediante trampas adhesivas.

### *Identificación y eliminación de elementos de riesgo medioambientales*

El plan de medidas de control ambiental incluye, además de la identificación de las zonas de riesgo, la aplicación de medidas de saneamiento ambiental, esto es, el desbrozado y eliminación de vegetación, restos de poda y acúmulos de materia

orgánica; la limpieza de parcelas y parques; el desbroce de márgenes de carreteras; la eliminación vivares y de madrigueras de roedores; el sellado de grietas y registros; la limpieza de la red de alcantarillado y de recogida de aguas pluviales; la eliminación de vertidos, etc., así como la divulgación de información y de recomendaciones a los particulares.

Uno de los aspectos más complicados del plan de control ambiental fue la coordinación de las medidas que debían acometer cada uno de los organismos implicados, según sus competencias. Se mantenían reuniones con los ayuntamientos implicados, así como con otras instituciones (Dirección General de Carreteras de la Comunidad de Madrid, Ministerio de Fomento, ADIF, Confederación Hidrográfica del Tajo y Universidad Rey Juan Carlos) y se elaboraban informes específicos con las actuaciones ambientales que debían llevarse a cabo por cada una de ellas, incluyendo su correspondiente georreferenciación espacial.

### Plan de comunicación y educación para la salud

La elaboración de un adecuado plan de comunicación con actividades de formación, comunicación y educación para la salud, ha sido fundamental para contribuir a la erradicación de este brote.

Desde el inicio se puso en marcha un plan comunicación de riesgos, así como diferentes iniciativas de educación para la salud, dirigidas tanto a población general como a los profesionales sanitarios, contando para ello con una gran variedad de recursos, técnicas, soportes y espacios de comunicación. Las actuaciones se diferenciaron según el tipo de población destinataria, priorizando el trabajo con las poblaciones especialmente vulnerables.

El objetivo era, en primer lugar, conseguir transmitir confianza a la población, siendo transparente y dando información comprensible. Eran muchas las preocupaciones existentes y fue clave comunicar con prontitud, desde el momento en que se tuvieron las primeras certezas del origen del brote, así como informar periódicamente a los municipios sobre su evolución epidemiológica.

Se contó, en todo momento, con el imprescindible apoyo de las redes institucionales sanitarias, educativas y municipales de la zona. La coordinación de las actuaciones con todas ellas ha sido fundamental.

Las actividades de comunicación contribuyeron a mejorar la capacidad de intervención de la red de centros y profesionales sanitarios implicados en el brote. Entre otros aspectos, en la detección precoz de la enfermedad.

A modo de resumen las actividades llevadas a cabo en materia de comunicación y educación para la salud en las diferentes poblaciones destinatarias han sido las siguientes:

### Población general

Por parte de la Consejería de Sanidad y los ayuntamientos se realizó una importante campaña de información, comunicación y educación sanitaria dirigida a los ciudadanos y profesionales de la zona, difundiendo información específica en centros educativos, centros de mayores, etc.

Se elaboraron folletos con medidas de protección personal frente a picaduras y carteles informativos sobre la enfermedad, que se distribuyeron y colocaron en puntos estratégicos: entrada de parques, polideportivos, hospitales, centros de salud, etc., y se contó con el apoyo de la prensa institucional local.

Figura 8. Cartel y folleto informativo sobre leishmaniasis.



Se preparó una presentación divulgativa en formato digital con información básica sobre la enfermedad y las medidas básicas para su prevención, así como una hoja de recomendaciones para la población usuaria de Centros de Salud.

Se emplearon también las redes sociales como el twitter institucional de la Comunidad de Madrid de información al ciudadano.

Todos estos recursos informativos se publicaron en el Portal Salud de la web de la Comunidad de Madrid y en páginas web de los ayuntamientos.

### *Propietarios de perros*

Se difundieron folletos informativos sobre leishmaniasis para los propietarios de perros, a través de las clínicas veterinarias y los Centros de Protección Animal.

Asimismo, se distribuyó un documento con recomendaciones a titulares de explotaciones ganaderas y núcleos zoológicos.

### *Profesionales sanitarios*

Se mantuvo informados, mediante sesiones periódicas, a los equipos médicos y de enfermería de Centros de Atención Primaria y Hospitales, así como a los veterinarios, mediante visitas personalizadas a las clínicas y la organización de sesiones informativas, y a los profesionales de las oficinas de farmacia. Además, se elaboró un argumentario con las preguntas más frecuentes de la enfermedad, disponible en el Portal Salud de la web de la Comunidad de Madrid.

Se realizaron reuniones informativas con las Direcciones Asistenciales de la zona afectada y con hospitales.

Se elaboraron diversos informes y documentos técnicos dirigidos a los profesionales sanitarios, informándoles, en todo momento, sobre la situación epidemiológica del brote.

### *Ámbito escolar*

En este ámbito se tuvieron también diversas reuniones con las autoridades educativas, y se realizaron jornadas técnicas informativas dirigidas a todos los centros escolares de la zona, distribuyendo en ellos material didáctico sobre el tema.

### *Medios de comunicación*

Los medios tienen un papel fundamental en la difusión de la información. En la zona del brote existen diferentes tipos de medios locales con los que desde hace tiempo los Servicios Territoriales de Salud Pública colaboran asiduamente. En ese contexto, se prepararon diferentes productos comunicativos sobre leishmaniasis (cuñas de radio, argumentarios para entrevistas, artículos, etc.) para ser utilizados durante el periodo de riesgo de esta enfermedad, incluyendo, entre ellos, información para incorporar a las webs municipales de la zona.

Por último, hay que destacar dos hechos muy relevantes:

- El primero, la comunicación del brote que se realizó a la comunidad científica en el Congreso Internacional de Leishmaniasis, organizado por la Organización Mundial de la Salud en el Instituto de Salud Carlos III de Madrid en marzo de 2012, donde se expusieron los datos epidemiológicos, la información ambiental y los conocimientos adquiridos sobre los reservorios y el vector.
- En segundo lugar, la edición en mayo de 2017, por parte de la Dirección General de Salud Pública, del libro titulado «Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios», que recoge los avances científicos llevados a cabo en la investigación del brote, así como el complejo modelo de gestión. En este libro participaron un gran número de instituciones y autores, y con él se pretendía reflejar, pormenorizadamente, los trabajos, hallazgos y experiencias obtenidos en su gestión. Se presentó en el 6.º Congreso Mundial de Leishmaniasis celebrado en Toledo en mayo de 2017.

## **LOS SISTEMAS DE INFORMACION GEOGRAFICA**

El análisis espacial constituye una herramienta fundamental para conocer y comunicar la distribución y magnitud de los determinantes ambientales y caracterizar la exposición humana, como parte del proceso de toma de decisiones.

En la gestión del brote de leishmaniasis, los sistemas de información geográfica constituyeron un instrumento metodológico muy útil para conocer la distribución de los casos humanos, los reservorios (silvestres y domésticos) y los vectores. A su vez permiten generar hipótesis etiológicas, así como dirigir y evaluar las actividades de vigilancia y control.

El uso de estas herramientas en el campo específico de la sanidad ambiental es esencial porque la exposición de la población a factores de riesgo presentes en el ambiente se produce necesariamente en un determinado contexto espacial y temporal.

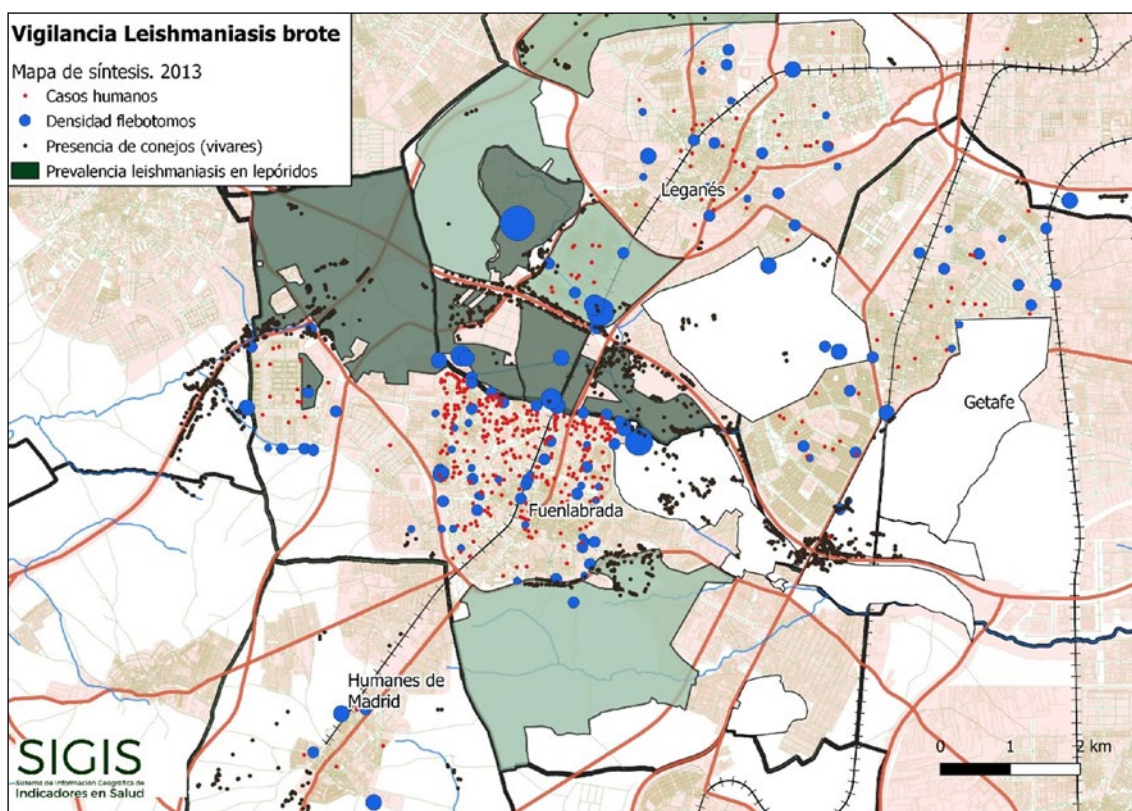
Fueron muchos los aspectos que se analizaron como:

- Las características y la evolución histórica del territorio donde se ubicaba el brote, la distribución de los casos humanos, la densidad y el análisis de clúster de las tasas brutas de casos humanos por secciones censales, etc.
- La densidad de los flebotomos y la evolución de su distribución espacio-temporal, así como diferentes estudios de detalle.
- La presencia de liebres y conejos en las proximidades de los núcleos urbanos, la prevalencia en lepóridos, los vivares de conejos, el avistamiento de liebres, la presencia de colonias de gatos, etc.
- Las actuaciones ambientales y la localización de los elementos de riesgo como imbornales, registros o tajeas.
- Mapa de síntesis, incluyendo distribución territorial de casos humanos, densidad del vector y prevalencia de reservorios ([Figura 9](#)).

Los resultados del análisis espacial pusieron de manifiesto que la zona con mayor concentración de casos coincidió espacialmente con áreas residenciales periféricas cercanas a espacios verdes con alta densidad de flebotomos, prevalencias elevadas de leishmaniasis en liebres y conejos y con ausencia de barreras territoriales. A esto se añadió la imposibilidad de la actividad cinegética tradicional en estos parques periurbanos y en los entornos de las vías de comunicación, lo que contribuyó a que existieran elevadas poblaciones de lagomorfos.

Por otra parte, las infraestructuras viarias, como por ejemplo las autovías de varios carriles, podrían haber tenido un papel relevante en la distribución espacial del brote, bien como barreras territoriales, que aíslan en cierta medida a algunos núcleos urbanos de la exposición al parásito, bien como generadores de un entorno de hábitats idóneo para el desarrollo del vector y de los reservorios.

**Figura 9. Síntesis de distribución territorial de casos humanos, vector y reservorio.**



Los sistemas de información geográfica y los métodos de análisis espacial son herramientas de gran utilidad para el análisis y la comprensión de la génesis y evolución de los brotes de enfermedades infecciosas.

## ASPECTOS CLAVE EN LA GESTION DEL BROTE

En la gestión de un brote de leishmaniasis de estas características, el más importante en la cuenca mediterránea hasta la fecha, se pueden destacar algunos aspectos relevantes, que nos pueden permitir prevenir o afrontar con más garantías otros brotes de esta enfermedad:

- Implicación de los responsables políticos al máximo nivel para asegurar una asignación suficiente de recursos técnicos y humanos y la aplicación de los recursos económicos necesarios.
- Constitución de un comité de gestión permanente, para priorizar y coordinar los numerosos trabajos que es preciso realizar, bajo una dirección y coordinación única.

- Delimitación de las actividades que debe acometer cada organismo o institución en función de sus competencias, estableciendo de forma clara la responsabilidad de cada uno (científica, técnica y de gestión).
- Implicación de la comunidad científica al máximo nivel, mediante la constitución de un comité científico.
- Disponer de sistemas de vigilancia del vector y de reservorios (doméstico y silvestre).
- Informar a la población con transparencia y de manera ágil y eficaz.
- Comunicación interna fluida entre todas las instituciones y equipos.
- Notificación de los casos y de sus peculiaridades a los servicios médicos de atención primaria y especializada.
- Puesta en marcha de un plan de medidas medioambientales.
- Empleo de Sistemas de Información Geográfica como herramienta de apoyo en el análisis y la toma de decisiones.
- Reevaluación periódica de la eficacia de las medidas aplicadas, modificando el programa cuando sea necesario.

## ENFOQUE «ONE HEALTH»

Nadie pone en duda las ventajas del enfoque «Una salud» («*One Health*»), para la prevención y detección de enfermedades zoonóticas. Parece la estrategia más idónea, ya que nos permite dar respuesta a las emergencias derivadas de estas enfermedades de forma más eficaz, basando las decisiones en evaluaciones de riesgo precisas y compartidas, contando para ello con los expertos más adecuados para cada tema. La colaboración entre los expertos de salud humana, animal y medioambiental, conduce a una comprensión más profunda de las enfermedades emergentes.

El brote de leishmaniasis del sur de Madrid nos puede servir de ejemplo de «*One Health*» por la intervención de forma coordinada de las autoridades de salud pública (vigilancia epidemiológica, sanidad ambiental y promoción de la salud), sanidad animal, medio ambiente, ayuntamientos, universidades y centros de investigación y otros (ADIF, Fomento, Canal de Isabel II, federaciones de cazadores, etc.). En este brote se abordaron con éxito aspectos clínicos, epidemiológicos, entomológicos y ambientales.

Sin embargo las instituciones en ocasiones no están lo suficientemente preparadas para trabajar de esta forma. No siempre están instaurados de forma estable los mecanismos de coordinación y las vías de comunicación entre todas las partes

implicadas. La coordinación interna también puede ser una debilidad en el caso de que no funcionen adecuadamente. Es deseable establecer sistemas coordinados de vigilancia que engloben tanto la epidemiología humana con la sanidad ambiental, sin olvidar el sistema asistencial, con el fin de mejorar la detección precoz de enfermedades emergentes y evitar la infranotificación.

En materia de zoonosis no alimentarias es un reto potenciar los sistemas de vigilancia de fauna silvestre (liebres, conejos, rumiantes, aves, jabalíes, carnívoros, etc.), así como estudiar el papel que pueden desempeñar nuevos reservorios, como por ejemplo los roedores y otros grupos animales como posibles reservorios de *Leishmania*. Otra faceta que puede mejorar en esta metodología de trabajo es la ligada a la educación sanitaria, tanto la dirigida a ciudadanos como a profesionales. La comunicación de riesgos es fundamental para que se tome conciencia de la importancia y la gravedad de ciertas enfermedades, así como de las medidas preventivas que están al alcance de la población. Tenemos que apoyarnos en medios tradicionales y también en nuevos medios de comunicación, como las redes sociales o en nuevas herramientas, como las aplicaciones informáticas (apps), que nos permiten llegar a un porcentaje elevado de población; y colaborar con colectivos específicos, como los colegios profesionales, las farmacias o las clínicas veterinarias. También es importante en los planes de comunicación contar con informadores claves, que tengan un buen conocimiento de la situación y sean reconocidos como expertos.

Es preciso, también, avanzar en la coordinación, tanto interna como externa, compartiendo la información entre todos los sectores y agentes implicados, lo que nos permitirá emplear los recursos (humanos, técnicos y económicos) de forma más eficaz y, de esta manera, ser más ágiles en la respuesta.

En resumen, es por tanto imprescindible un abordaje coordinado y multidisciplinar para hacer frente a cualquier riesgo originado en la interfaz hombre-animal-medio ambiente, y el brote de leishmaniasis de la zona sur de la Comunidad de Madrid es un clara muestra de este enfoque «*One Health*».

## AGRADECIMIENTOS

A todos los profesionales de la Dirección General de Salud Pública, tanto de servicios centrales como territoriales de las Unidades Técnicas 9 y 10, que han trabajado en la gestión del brote desde diferentes ámbitos: sanidad ambiental, epidemiología, y promoción de la salud, así como a otras unidades de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid que también han colaborado en su gestión.

A la Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Agricultura y a los ayuntamientos implicados de Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid, tanto por su trabajo en la vigilancia, como por las importantes actuaciones de control ambiental llevadas a cabo.

A las universidades y centros de investigación mencionados en este artículo, por su inestimable apoyo laboratorial y asesoramiento científico.

## REFERENCIAS

1. «Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios». Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. Mayo 2017.
2. Los mapas que aparecen en este capítulo se han elaborado con el programa QGIS versión 3.10.10 - A Coruña.

## CAPÍTULO 2

# Manejo clínico de la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis ganglionar localizada por *L. Infantum* en España. Un enfoque práctico

**Juan Víctor San Martín**

Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna.  
Hospital Universitario de Fuenlabrada.

CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

## OBJETIVO

La OMS publicó en 2017 una guía internacional con recomendaciones para el manejo de la leishmaniasis visceral (LV) por *L. infantum* en Europa y el Área Mediterránea (1). Mi intención es afinar estas guías a la realidad práctica del día a día del clínico en nuestro entorno y a las novedades más recientes, especialmente introduciendo la experiencia adquirida en el uso de los biomarcadores durante el brote de Fuenlabrada.

Brevemente haré referencia a la leishmaniasis ganglionar o linfadenopática localizada, y posteriormente a la leishmaniasis visceral.

## LINFADENOPATÍA LEISHMANIÁSICA LOCALIZADA (LLL)

### LLL. Clínica

Es una forma de presentación infrecuente de la leishmaniasis, exclusiva de pacientes inmunocompetentes, que consiste en la aparición de adenopatías localizadas no dolorosas, sin ninguna clínica sistémica, sin citopenias y con reactantes de fase aguda normales (2,3).

La adenopatía puede ser única o múltiple, pero en el mismo grupo ganglionar. Es característico que la adenopatía lleve varios meses cuando el paciente consulta. Puede ir o no precedida de una lesión de leishmaniasis cutánea (LC) ya resuelta, que drenaría en el grupo ganglionar afectado.

Existen muy pocos casos documentados por *L. infantum*, cuya interpretación puede ser confusa por su capacidad para producir LC y LV en pacientes inmunocompetentes. La experiencia del brote de Fuenlabrada demostró que los pacientes que cumplen la definición de LLL causada por *L. infantum*, se asemejan en su comportamiento benigno al de otras especies dermatotrópicas. Podemos considerarla como una afectación local más profunda que la LC, pero totalmente diferente a una LV (3).

No todos los pacientes con leishmaniasis en los ganglios tienen una LLL. La presencia de linfadenopatías como forma de presentación de leishmaniasis se ha descrito en el contexto tanto de LV como de LC. Por un lado, la aparición de adenopatías, habitualmente diseminadas, puede ser una manifestación clínica más añadida a las típicas de la LV clásica o kala-azar, que por razones no bien conocidas se ha descrito con más frecuencia en las series de LV del Este de África, atribuidas a *Leishmania donovani* (4). También puede aparecer con más frecuencia en pacientes inmunodeprimidos (3,5). El manejo de estos pacientes es el mismo de la LV. Por otro lado, la presencia de adenopatías satélites de lesiones de LC puede ser la manifestación clínica dominante del cuadro, habiéndose descrito casos con *L. braziliensis* (6), *L. tropica* (7) o *L. major* (8), y su manejo suele englobarse dentro de la LC.

### LLL. Diagnóstico

En la mayoría de los casos descritos, incluidos todos los del brote de Fuenlabrada, el diagnóstico se realizó por punción aspiración con aguja fina (PAAF) de la adenopatía, permitiendo el diagnóstico por microscopía (3,9,10). El hallazgo histológico típico en nuestra serie fue la presencia de una linfadenitis granulomatosa no necrotizante, con visualización de amastigotes de *Leishmania* dentro de los histiocitos. Sin embargo, se han descrito hasta cinco variantes histológicas, incluidas linfadenitis sin granulomas o linfadenitis con granulomas necrotizantes (10). Hay consenso en que a mayor número de granulomas y mayor grado de necrosis, menor número de parásitos, que incluso pueden pasar desapercibidos, habiéndose propuesto en el contexto de la linfadenitis granulomatosa la recomendación de incluir una PCR de *Leishmania* (11).

Dado que no es práctica habitual solicitar PCR de *Leishmania* en pacientes con adenopatías localizadas con linfadenitis granulomatosa, se desconoce realmente la incidencia de esta forma de presentación en nuestro medio. En la serie del brote de Fuenlabrada, hasta el 19 % del total de casos no cutáneos fue LLL (3). En definitiva, en nuestro medio debe incluirse la leishmaniasis en el diagnóstico diferencial de una adenopatía con histología de linfadenitis granulomatosa.

Respecto a la serología, en la serie de Fuenlabrada, la determinación por ELISA sólo fue positiva en 18 de los 24 (66%) casos con LLL, y por rK39 en 3 de 10 (30%), porcentajes intermedios entre la LC y la LV (12), «una gran cantidad de pequeños cuerpos redondeados u ovalados de 2 a 3 micras de diámetro, diferente a todo lo descrito hasta entonces» (1). La PCR en sangre suele ser negativa, su positividad nos obligaría a descartar una LV.

### LLL. Tratamiento

No hay ensayos clínicos sobre el manejo de esta entidad. La información proviene de casos clínicos aislados o pequeñas series de casos que se han manejado de forma heterogénea. Se han descrito casos de resolución espontánea de las adenopatías, especialmente con *L. major* y *L. tropica* pero también con *L. infantum* (3,13) aunque la mayoría de los autores sobre todo en los casos por *L. infantum* usaron las pautas de tratamiento estándar para LV (2,3).

En nuestra experiencia adquirida durante el brote, ningún caso que cumpliera la definición de LLL progresó a LV. En 3 pacientes la adenopatía desapareció espontáneamente, aunque en el transcurso de varios meses. El resto de casos se trató con anfotericina B liposomal (L-AmB), aunque con diferentes esquemas y dosificación de tratamiento (10-21 mg/kg dosis total). Al analizar la respuesta de forma retrospectiva, no encontramos diferencias en la tasa de respuesta a fin de tratamiento ni en las recaídas entre las diferentes dosis de L-AmB. Por ello, pensamos que los pacientes que cumplen criterios de LLL por *L. infantum* pueden tratarse con dosis más bajas de las recomendadas para la LV del área mediterránea, siendo la propuesta una dosis de L-AmB a dosis de 10 mg/kg dosis total (por ejemplo, dos dosis consecutivas de 5 mg/kg/día). Incluso en casos seleccionados se podría plantear observación clínica sin tratamiento. Sería deseable que esta propuesta se comparara en un ensayo clínico con la pauta estándar y con la observación clínica, aunque la rareza de esta entidad hace difícil que vaya a ser posible su realización.

### LLL. Resumen

En nuestro medio, la presencia de una adenopatía localizada sin datos de afectación sistémica y con hallazgos de linfadenitis granulomatosa, con o sin necrosis caseificante, debe hacer considerar el diagnóstico de LLL en pacientes residentes o procedentes de áreas endémicas. Aunque se trata de una entidad benigna, diagnosticar al paciente evitará pruebas complementarias invasivas o costosas, como por ejemplo biopsias de ganglio o PET-TAC, así como tratamientos empíricos iatrogénicos, como tuberculostáticos o esteroides.

## LEISHMANIASIS VISCERAL (LV)

### IV. Clínica

#### Cuando sospechar una LV

La forma de presentación habitual en nuestro medio sigue siendo la clásica del kala-azar: fiebre y síndrome constitucional, de unas cuatro semanas de evolución, con esplenomegalia, pancitopenia e importante elevación de reactantes de fase. La triada fiebre, síndrome constitucional y esplenomegalia estuvo presente en más del 90% de los pacientes inmunocompetentes con LV de nuestra serie del brote (14). Sin embargo, es habitual el retraso diagnóstico de la LV si no se piensa en ella, por lo que es importante mantener un alto grado de sospecha.

Los síntomas son poco virulentos y van fluctuando de forma progresiva a lo largo de varias semanas. La fiebre, incluso siendo elevada, suele ser bien tolerada, no constante y habitualmente no impide al paciente continuar con su actividad habitual. Se describe como una fiebre sin focalidad, pero en nuestra experiencia un número de pacientes no desdeñable referían síntomas focalizadores en la anamnesis dirigida que a veces dificulta el diagnóstico, destacando cefalea (38%), tos (32%) o síntomas digestivos (22%) (12). La astenia, anorexia y pérdida de peso que definen el síndrome constitucional son igualmente de lenta aparición y presentan un diagnóstico diferencial muy amplio.

En las primeras semanas, la pancitopenia no suele ser completa, en nuestra experiencia la trombopenia suele ser el primer dato alterado del hemograma. Los reactantes se van elevando de forma progresiva, y, aunque pueda ya encontrarse cierto grado de esplenomegalia, la combinación de fiebre con síntomas focalizadores inespecíficos, esplenomegalia y trombopenia puede ser fácilmente confundida con un cuadro viral. En nuestra serie la LV fue muy prevalente en la población subsahariana residente en nuestra zona, escenario en el que puede confundirse con malaria (14). Así, en un entorno clínico de baja sospecha el diagnóstico se retrasa, como ocurrió en nuestra serie en la que la media de retraso diagnóstico al inicio del brote fue de 30 días.

#### Clínica en inmunodeprimidos

Como en otras tantas entidades infecciosas, los pacientes inmunodeprimidos presentan con mayor frecuencia formas de presentación atípicas de LV. Ejemplos son la leishmaniasis mucosa o la LV crónica activa (ver apartado 2.1.4), y que son casi exclusivas de inmunodeprimidos.

Respecto a la presentación clásica, está descrito y es nuestra experiencia que la presentación clínica en pacientes inmunodeprimidos con LV puede ser más larvada (14). Pueden estar ausentes la fiebre y la esplenomegalia, y los reactantes de fase aguda estar menos elevados, ya que muchos de estos hallazgos son reflejo de la respuesta inmune del paciente (15,16). En cambio, la pancitopenia suele estar presente en casi todos los pacientes inmunodeprimidos no VIH, pero puede pasar desapercibida al ser fácilmente achacable a otras etiologías, como la propia enfermedad de base o a alguno de los fármacos inmunosupresores, que suelen producir alteraciones de las células sanguíneas.

De nuevo mantener un alto grado de sospecha es esencial, especialmente en pacientes no VIH.

### Linfohistiocitosis Hemofagocítica (HLH) o síndrome hemofagocítico

La linfohistiocitosis hemofagocítica es un síndrome clínico provocado por la activación descontrolada de linfocitos T, células NK y macrófagos que a su vez producen una reacción inflamatoria exagerada mediada por la hiperproducción de citocinas. Aunque hay casos primarios con un componente claramente genético, son más frecuentes los HLH secundarios, habitualmente desencadenados por tumores o patógenos infecciosos, y que suelen asociarse a una mortalidad muy alta incluso con tratamiento específico, que incluye quimioterápicos e inmunosupresores. Los criterios que definen este síndrome se describen en la [Tabla 1](#).

**Tabla 1. Criterios diagnósticos de HLH secundaria (deben cumplirse 5 de 8 criterios) (17).**

Fiebre
Esplenomegalia
Citopenias (al menos 2 líneas celulares): Hb < 9 g/dL; neutrófilos < 1000/L, plaquetas <100000/L
Hipertrigliceridemia (260 mg/dL) y/o hipofibrinogenemia (< 1.5 g/L)
Ferritina mayor de 500 microg/l
sCD 25 mayor de 2400 U/mL
Actividad NK disminuida o ausente
Hemofagocitosis en médula ósea, líquido cefalorraquídeo o ganglios linfáticos

En nuestra serie, el 38% de los pacientes con LV cumplían criterios de HLH (14). Diferentes series muestran cifras similares (18,19). LV es una de las causas poco conocidas de HLH secundaria, pero es muy importante conocer que los pacientes con LV que cumplen criterios de HLH no tienen peor pronóstico, ni mayor mor-

talidad ni recaída, siendo su respuesta a tratamiento similar a la del resto de LV. Así, mientras la mortalidad de la HLH secundaria en global resulta superior al 50%, en la LV los pacientes se curan con tratamiento adecuado de la LV.

Dentro de los criterios de HLH, es de especial interés la elevación de la ferritina, que en nuestra serie alcanzó niveles con una mediana de 6000 microgramos/L. Se trata de una prueba de fácil determinación en cualquier laboratorio, disponible en el día de la realización, y de gran utilidad para aumentar la sospecha clínica en el contexto de un paciente con fiebre sin focalidad.

Como conclusión, es obligado ante cualquier paciente diagnosticado de linfocitosis hemofagocítica (HLH) descartar LV. En los pacientes con HLH y LV nunca debe plantearse tratamiento específico de HLH con etopósido o similar, el tratamiento antiparasitario es eficaz y suficiente.

### Leishmaniasis visceral crónica activa

Esta forma clínica es característica de pacientes con inmunodepresión muy severa, como los pacientes con infección crónica por VIH con menos de 100 CD4 o pacientes trasplantados. Se trata de pacientes oligosintomáticos, con parasitemia persistentemente positiva y con frecuentes recaídas clínicas, que responden parcialmente a tratamientos y retratamientos sin conseguir erradicar el parásito. Se propuso la denominación «crónica» debido a la presencia de recaídas durante un período de varios años y «activa» debido a la circulación sanguínea continua del parásito, que se sigue multiplicando a pesar del tratamiento (20). Se trataría de pacientes virtualmente «colonizados» por *Leishmania*, considerados incurables salvo que se revierta su inmunodepresión. El manejo clásico consiste en profilaxis indefinida, estrategia que no consigue controlar la infección, siendo frecuentes las recaídas clínicas que requieren ciclos de retratamiento.

En la LV crónica activa se ha encontrado invasión en múltiples órganos. Al tratarse de pacientes con macrófagos cargados de *Leishmania*, puede aparecer clínica virtualmente en cualquier localización. Se ha descrito en este contexto afectación pulmonar, gástrica, colónica, cutánea (similar a PKDL), ganglionar, hepática, renal y ocular (21-24). Se asume que la inmunodepresión típica de estos pacientes explica la ausencia de algunas manifestaciones típicas de la LV que dependen de la respuesta inmune, como la fiebre o la elevación de reactantes inflamatorios.

El manejo de estos pacientes es complejo ya que es necesario el desarrollo de una respuesta celular específica frente a *Leishmania*, que se ve comprometida al ser diana tanto de *Leishmania* y como del VIH.

## LV y autoinmunidad

La fisiopatología de la LV y la activación desproporcionada e ineficiente de la respuesta humoral se refleja en una importante hipergammaglobulinemia, en ocasiones con formación de inmunocomplejos. Así, es frecuente la positividad tanto de autoanticuerpos como de serologías de otros microorganismos (30% en nuestra serie), como *Borrelia* o *Coxiella* (14). En el contexto de una LV puede ser positivo prácticamente cualquier autoanticuerpo, por ejemplo se han descrito ANAs, factor reumatoide, Coombs, Ac anti-músculo liso, anti-dsDNA, anticoagulante lúpico, anti-CCP, anti-Sm, anticardiolipina, ANCA, antimitocondriales y antitiroideos (16). Por ello, no es de extrañar que se hayan comunicado, tanto pacientes con diagnóstico erróneo de LES que resultaron ser LV, como pacientes con LES confirmado que fueron tratados de brote cuando presentaban LV. Incluso pacientes que debutaron con glomerulonefritis como primera manifestación clínica de una LV, en el contexto de una crioglobulinemia tipo III (24).

Las cifras de complemento son normales en el contexto de LV, por lo que se ha destacado que en un paciente con criterios de LES que tenga complemento normal una posibilidad es que se trate de una LV. En resumen, debemos tener cuidado con la interpretación de las serologías y los autoanticuerpos en el contexto de fiebre sin foco, e incluir siempre IgG *Leishmania* en nuestro área en sospechas de enfermedad autoinmune.

## LV. Diagnóstico clínico

### Algoritmo diagnóstico

Para mayor profundidad en las técnicas diagnósticas de laboratorio existe un capítulo específico en este tratado, aquí nos centraremos en cómo adaptar las técnicas diagnósticas recomendadas a nuestro entorno.

Las técnicas más utilizadas para aumentar la probabilidad de confirmar el diagnóstico serían:

- Serología (Ac anti-leishmania).
- Métodos moleculares (PCR) en sangre (u otros órganos).
- Aspirado de médula ósea para microscopía óptica y test moleculares (PCR).

Respecto a la serología, es fundamental estimar la prevalencia de la enfermedad en la población (Figuras 1 y 2). En situaciones de alta prevalencia, como un brote epidémico similar al de Fuenlabrada, el test rápido basado en detectar anticuerpos contra el antígeno rK39 es de gran utilidad, por su elevada especificidad y mayor

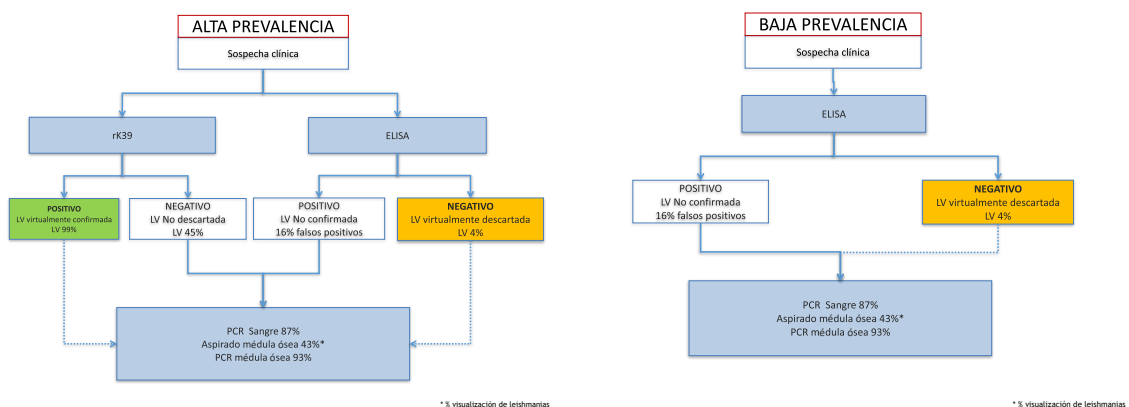
rapidez, permitiendo diagnosticar un gran número de casos en pocos minutos. Sin embargo, en este contexto la prueba pierde valor predictivo negativo y un resultado negativo no excluye LV. En la situación habitual de endemia en nuestro país, la serología convencional (IFI, ELISA) debe ser el método inicial de cribado, ya que su mayor sensibilidad permitiría descartar LV en casos de baja sospecha. En cualquiera de ambos escenarios y si existe una alta sospecha clínica, la serología convencional no debe ser la única prueba para el diagnóstico. Por un lado, en zonas endémicas como nuestro entorno la seroprevalencia puede ser elevada en pacientes asintomáticos, con el riesgo de falsos positivos. Por otro, en pacientes inmunodeprimidos está descrita mayor probabilidad de falsos negativos de la serología.

Los estudios moleculares (PCR), principalmente en sangre y en aspirado de médula ósea, se consideran en la actualidad la técnica de diagnóstico más sensible y específica, siendo el gold estándar de referencia, y suelen estar disponibles en la mayoría de laboratorios hospitalarios. La rentabilidad en diferentes estudios es algo mayor en médula ósea, pero en sangre se encuentra por encima del 85%.

El cultivo no es útil para el diagnóstico, por su baja sensibilidad y retraso en el resultado, pero permite recuperar el parásito vivo para identificar especie y eventuales pruebas posteriores. Suele exigir enviar la muestra a laboratorios de referencia especializados.

Otras muestras, obtenidas por aspirado o biopsia, pueden ser útiles si existen datos de afectación de órganos concretos, por ejemplo, hígado o adenopatías. Por el contrario, la punción esplénica, considerada clásicamente la muestra de referencia, tiene un riesgo de complicaciones si no es realizada por expertos, por lo que desaconseja su uso en nuestro medio.

**Figuras 1 y 2. Algoritmo de diagnóstico propuesto en nuestro medio en función de la prevalencia de leishmaniasis en la población.**



## Pruebas de imagen

No existe ninguna recomendación al respecto, y en general no se consideran necesarias en el algoritmo diagnóstico. Sin embargo, en nuestra experiencia, es habitual que las técnicas de imagen se realicen en el proceso diagnóstico a veces no tan evidente de leishmaniasis. Las técnicas de imagen que permiten visualizar el tamaño del bazo (ecografía abdominal, TAC abdominal), habitualmente disponibles en nuestro medio hospitalario, pueden ser de utilidad ya que ayudan a elevar la sospecha clínica si se documenta la presencia de esplenomegalia. Por otro lado, el tamaño del bazo es un dato indirecto de la carga parasitaria de la LV, aunque no se ha demostrado la incidencia de este dato sobre el tratamiento o sobre el pronóstico.

## Aspirado de médula ósea

Una clínica compatible y una PCR positiva en sangre son suficientes para confirmar LV. Sin embargo, es recomendable realizar el aspirado de médula por varios motivos. Actualmente, la detección de DNA de *Leishmania* en médula ósea se considera la técnica gold-standard para el diagnóstico de LV, siendo algo más rentable en nuestra experiencia que la detección en sangre (14). Además, si no tenemos disponibles técnicas moleculares o se retrasan, la visualización de *Leishmania* por un ojo experto de las muestras de aspirado se realiza el mismo día de la técnica y puede dar el diagnóstico más rápido. Incluso aunque no se visualicen parásitos, se ha descrito un patrón morfológico de médula ósea con un alto valor predictivo positivo para LV: una relación mielo-eritroide disminuida, con un porcentaje elevado de células plasmáticas y el hallazgo de fagocitosis no solo de elementos eritroides, sino de plaquetas y leucocitos, se asociaron de forma significativa a LV (25). Finalmente, es más fácil recuperar la cepa viable desde la médula ósea, lo que puede ser de utilidad para futuros estudios de resistencia.

## IV. Tratamiento

### Introducción

Deben recibir tratamiento las personas que cumplan los criterios de definición de LV activa: aquellas con síntomas clínicos y con diagnóstico microbiológico de LV. Las personas con infección documentada por *Leishmania* pero asintomáticas se aconseja que sean vigiladas y se traten solamente si desarrollan síntomas (26).

Desgraciadamente, no existe en este momento ninguna pauta con evidencia máxima para recomendar el tratamiento de LV por *L. infantum*, al no existir ensayos doble ciego para ningún fármaco (1). Desde 2010, estas recomendaciones se sepa-

raron en función de especie y zona geográfica, ya que tampoco se puede inferir que pautas eficaces en ensayos clínicos para *L. donovani* sirvan para *L. infantum* (26).

## Fármacos

Los fármacos de primera línea para el tratamiento de LV por *L. infantum* son la anfotericina B liposomal (L-AmB), la miltefosina y los antimoniales. Otros fármacos comercializados que han mostrado actividad anti-leishmaniásica pero que no comentaremos aquí en detalle son la paramomicina, la pentamidina, el alopurinol y los azoles (itraconazol, fluconazol) (27).

### *Anfotericina B liposomal (L-AmB, Ambisome®), vial de 50 mg)*

#### Dosis habitual

En nuestro medio se considera **L-AmB en monoterapia la primera línea de tratamiento para la LV**, aunque las dosis recomendadas son diferentes para inmunocompetentes, inmunodeprimido VIH e inmunodeprimido no VIH, y se detallan en el epígrafe 2.3.5. de pautas recomendadas.

#### Toxicidad

- Reacción aguda relacionada con la infusión de L-AmB

Es una reacción leve pero bastante frecuente. Se han descrito fiebre, tiritona, dolor lumbar, dolor abdominal, dolor torácico, disnea, hipoxia, flushing y urticaria durante la infusión. Estos síntomas se han puesto en relación con una reacción del endotelio a los liposomas, y no es un mecanismo relacionado con una reacción alérgica. Es más frecuente si la infusión es rápida.

Para prevenirlo, aconsejamos de forma rutinaria realizar la infusión en 90 minutos y premedicación con paracetamol 1g unos 15 minutos antes de la administración del fármaco. Si a pesar de ello se produce, se debe parar la infusión hasta que se resuelva la clínica, y se puede plantear administrar hidrocortisona 50 mg intravenoso. Una vez resuelto se puede reanudar la infusión más lentamente, y se puede administrar en los días siguientes añadiendo 1 vial de dexclorfeniramina (Polaramine®) al paracetamol como premedicación.

- Nefrotoxicidad

La anfotericina produce nefrotoxicidad por varios mecanismos, que se traducen finalmente en vasoconstricción y daño tubular distal. Las consecuencias

son una elevación de creatinina, hipokalemia e hipomagnesemia. La probabilidad de daño renal es mayor a mayor dosis acumulada. Este daño es reversible para las pautas habitualmente utilizadas, aunque el uso continuado de L-AmB (por ejemplo, en las clásicas pautas de profilaxis secundaria de años de duración) puede llevar a un daño crónico. Para prevenir este problema se debe asegurar una hidratación adecuada previa a la infusión (parenteral con suero salino si es necesario), evitar otros nefrotóxicos y diuréticos concomitantes, y optimizar los niveles de potasio previos a la infusión.

#### Otras consideraciones

Los viales de Ambisome® deben conservarse a menos de 25 °C (en nevera), y una vez reconstituidos a temperatura ambiente, administrarse en las siguientes 24-48 horas. La reconstitución es compleja y debe realizarse en las cabinas de Farmacia preparadas para tal fin.

#### *Miltefosina (Impavido®, comprimidos 50 mg)*

##### Dosis habitual

Es la única opción oral de tratamiento. En mayores de 12 años y peso > 50 kg la dosis recomendada es Miltefosina 150 mg/día repartidos en 3 dosis. En niños se demostró que en muchos casos la falta de eficacia se relacionada con un mal ajuste de dosis, por lo que se han recomendado diferentes pautas ajustadas a edad y peso (28,29).

Se puede conservar a temperatura ambiente y se debe tomar con comidas.

##### Toxicidad

Son frecuentes los síntomas digestivos inespecíficos, como náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal, que suelen ser dosis dependientes. Se ha recomendado pre-medicación con domperidona 30 minutos antes de la toma para paliar estos síntomas.

Se han descrito elevaciones de enzimas hepáticas y de creatinina que no suelen frecuentes ni tener relevancia clínica, aunque contraindican el uso de miltefosina en caso de insuficiencia hepática y renal, por falta de datos en estos escenarios.

### Antimoniales (*Glucantime®*, vial de 1500 mg de antimoniato de meglumina)

#### Dosis habitual

En nuestro país está disponible el antimoniato de meglumina. La pauta recomendada de tratamiento es 20 mg de  $Sb^{5+}$ /kg/día, que equivalen a 75 mg de antimoniato de meglumina/kg/día, durante 28-30 días. El preparado comercial del antimoniato de meglumina es *Glucantime®*. Cada ampolla tiene 5 ml, y contiene 1500 mg de antimoniato de meglumina, que corresponden a 405 mg de antimonio. Es decir, la concentración de la solución es de 300 mg de antimoniato por mililitro, que corresponden a 81 mg de antimonio por mililitro. Así, una persona de 70 kg debería recibir 17 ml al día de *Glucantime®*: 3 viales y medio repartidos por ejemplo en 1 inyección de 10 ml y otra de 7 ml cada día.

El otro antimonial comercializado es el estibogluconato de sodio (SSG, *Pentostam®*) no está disponible en nuestro país.

#### Toxicidad:

Los antimoniales han pasado a una segunda línea de tratamiento por su alta toxicidad, que es acumulativa, con mayor riesgo a mayor dosis empleada.

- **Pancreatitis:** es frecuente que durante el tratamiento se detecte un aumento de lipasa en rango de pancreatitis, aunque es poco frecuente que se presenten síntomas. La lipasa vuelve a la normalidad al finalizar el tratamiento.
- **Arritmias cardíacas:** son frecuentes los cambios en los trazados del ECG durante el tratamiento, especialmente inversión de la onda T y prolongación del intervalo QT. Estos cambios son dosis-dependientes y reversibles, pero pueden ser fatales en pacientes con cardiopatía previa o QT largo.
- **Hepatotoxicidad:** aunque rara, puede ser muy grave, y en caso de presentarse no debe reintroducirse el fármaco.

Estos riesgos son más frecuentes en caso de insuficiencia hepática y renal, escenarios en los que los antimoniales están totalmente contraindicados.

### Conceptos generales sobre el tratamiento: curación y biomarcadores

*Leishmania* es un parásito intracelular con una alta capacidad de adaptación y a menudo difícil de erradicar en su totalidad, habiéndose descrito casos de recaídas cutáneas años después de la primoinfección y aparente cura (30,31), así como la conocida persistencia de parásito replicando durante años en la ya citada LV crónica activa (32). Hay consenso en que la «curación parasitológica», es decir, la erradica-

ción de *Leishmania*, es difícil de asegurar con las técnicas actuales. Por ello, se han propuesto diferentes definiciones y conceptos sobre cuándo y cómo se considera a un paciente curado. En los tratados de la OMS sólo se incluyen valoraciones clínicas, al no existir evidencia concluyente hasta la fecha de ningún test de cura (1,26,33), y que se trata de documentos orientados a las zonas donde leishmaniasis es más prevalente, habitualmente escasas de recursos técnicos. Estos conceptos ayudarían a la toma de decisiones sobre las pautas a elegir en cada caso, como luego veremos. Podemos resumirlos (Tabla 2):

- Tras el final de la primera parte del tratamiento (tratamiento inicial o de inducción), se consideraría:
  - **Curación clínica inicial:** mejoría clínica tras finalizar el tratamiento.
    - No puede asegurarse la «curación parasitológica», este paciente sería considerado como «infectado asintomático».
  - **Fracaso de tratamiento:** no hay mejoría clínica o hay empeoramiento al finalizar el tratamiento. Se asume que se asocia a persistencia parasitológica.
- A final de seguimiento, que en nuestra opinión debe ser al menos 1 año:
  - **Curación clínica final:** el paciente persiste asintomático. Se consideraría lo más cercano a una «curación parasitológica».
  - **Recaída:** paciente con curación clínica inicial en el que reaparecen los síntomas y se confirma persistencia parasitológica.

Desde hace años se están ensayando diferentes biomarcadores que se asocian a curación final o a recaída, y que puedan ayudar a la toma de decisiones sobre los tratamientos de rescate o de mantenimiento. Sobre algunos de ellos no tenemos experiencia, como diferentes antigenurias en orina (34) o los niveles de IgG1 específicos de *Leishmania* (35). Destacamos los que hemos utilizado en nuestro grupo, que se desarrollan de forma más extensa en el capítulo específico, y que comentaremos más adelante:

- **Biomarcadores parasitológicos:** PCR (cuantitativa/cualitativa), xenodiagnóstico directo, xenodiagnóstico indirecto y cultivo.
- **Biomarcadores inmunológicos:** número absoluto de linfocitos CD4, CPA-SLA (respuesta celular específica frente a Ag soluble de *Leishmania*), y producción interferón-gamma (IGRA) u otras citoquinas proinflamatorias tras CPA-SLA.

Es conocido, en el contexto de la co-infección VIH-*Leishmania*, que los niveles bajos de CD4 son un biomarcador claramente asociado tanto al riesgo de padecer LV como de recaída, en caso de no recuperarlos tras el tratamiento de ambas entidades

(36). De esta manera, las guías actuales de manejo de estos pacientes vigentes en nuestro medio proponen plantear la retirada de profilaxis secundaria en los pacientes con CD4 superiores a 200-350, en los que se asumiría recuperación de la respuesta inmunológica (1). Nuestros datos apoyan que lo importante es recuperar la respuesta celular específica a *Leishmania* (CPA-SLA), y aunque ésta habitualmente asociada a mayor cifra de CD4, hemos encontrado casos con CD4 menores de 200 con respuesta CPA-SLA efectiva, que no recayeron; y casos con CD4 mayores de 350 sin respuesta CPA-SLA efectiva, que recayeron. En nuestra opinión, los biomarcadores inmunológicos dependientes de respuestas específicas CPA-SLA son superiores a la cifra absoluta de CD4 como predictores de recaída.

En diferentes estudios de nuestro grupo (37-41), hemos encontrado que, tras el tratamiento de una LV, podemos establecer la siguiente asociación respecto al riesgo de recaída tras el tratamiento de la LV:

- Biomarcadores parasitológicos negativos e inmunológicos positivos se asocian a BAJO riesgo de recaída. En esta situación no hay evidencia de replicación parasitaria y sí de existencia de respuesta celular específica eficaz.
- Biomarcadores parasitológicos positivos o inmunológicos negativos por el contrario se asocian a ALTO riesgo de recaída.

En base a los resultados de estos biomarcadores y de estas asociaciones con el riesgo de recaída, se han propuesto una serie de definiciones para determinar el estatus del paciente con curación clínica tras el tratamiento de una LV (39,40,42), y que serían complementarias a las propuestas por la OMS. Así, tras la «curación clínica», inicial o final, es muy importante diferenciar estos tres escenarios (ver [Tabla 2](#)):

- «**Portador**» **asintomático**: cuando algún biomarcador parasitológico permanece positivo. En ocasiones la PCR en sangre puede permanecer positiva transitoriamente a final de tratamiento, negativizándose en pocas semanas al desarrollarse respuesta celular. Si no es así y la PCR persiste positiva, estos pacientes tienen alto riesgo de recaída clínica ya que no desarrollan respuesta inmune. Estos pacientes no deben considerarse curados. Ésta es la situación en la que se encuentran los pacientes con «**LV crónica activa**» entre cada recaída clínica.
- «**Asintomático sin respuesta inmune a *Leishmania***», o «**no respondedor**»: hay evidencia de infección previa pero los marcadores parasitológicos e inmunológicos son negativos. No hay evidencia de replicación activa pero tampoco de que se haya desarrollado respuesta inmunitaria específica. Estos pacientes tienen mayor riesgo de recaída que los respondedores, aunque pueden acabar desarrollando respuesta.

- **«Asintomático con respuesta inmune a *Leishmania*», o «respondedor»:** cuando los marcadores parasitológicos son negativos y los inmunológicos son positivos. Estos pacientes «respondedores» tienen bajo riesgo de recaída a corto plazo ya que esta respuesta inmune se ha mostrado protectora.

Todos estos pacientes se definen como «curación clínica», pero tienen importantes diferencias pronósticas. Es esencial tras un tratamiento encuadrar a los pacientes con «curación clínica» en alguna de estas tres categorías. Solo deberíamos plantearnos considerar «curado» al paciente «asintomático con respuesta inmune a *Leishmania*», y no en todos los casos, como luego veremos. Por ejemplo, el estatus inmunológico de los pacientes puede modificarse, especialmente en pacientes que están recibiendo inmunosupresores. El grado de inmunosupresión puede ser fluctuante y pacientes que desarrollen respuesta celular la podrían perder si reciben mayor grado de inmunosupresión, por lo que es importante monitorizar este estatus tras el tratamiento en los pacientes inmunodeprimidos.

**Tabla 2. Escenarios y definiciones tras el tratamiento en base a biomarcadores.**

	Tiempo respecto a tratamiento	Síntomas	Biomarcadores parasitológicos	Biomarcadores inmunológicos	Riesgo de recaída	Pautas de tratamiento#
<b>Fracaso de tratamiento*</b>	Durante el tratamiento: no se alcanza curación clínica inicial	Sí	Positivos	Negativos	Alto	Extendido o Rescate
<b>Curación clínica inicial*</b>	Al final de tratamiento de inducción	No	¿?	¿?	¿?	-
<b>Curación clínica final*</b>	A los 6 meses (1 año) del final de tratamiento de inducción	No	¿?	¿?	¿?	-
<b>Asintomático respondedor</b>	En cualquier momento tras el tratamiento	No	Negativos	Positivos	Bajo	Ninguno
<b>Asintomático no respondedor</b>	En cualquier momento tras el tratamiento	No	Negativos	Negativos	Posible	Extendido o supresor
<b>Portador asintomático!</b>	En cualquier momento tras el tratamiento	No	Positivos	Negativos	Alto	Rescate
<b>Recaída*</b>	En cualquier momento tras curación clínica	Sí	Positivos	Negativos	-	Retratamiento o Rescate

# Ver texto para pautas de tratamiento.

\*Definiciones OMS.

! Si el portador asintomático ha tenido varios fracasos a tratamiento y recaídas se considera «LV crónica activa».

## Objetivos del tratamiento

La replicación activa de *Leishmania* (que se reflejaría con la presencia de biomarcadores parasitológicos positivos) impide el desarrollo respuesta celular eficaz y está asociada a recaída (43). Desde un punto de vista práctico, es necesario como primer paso que el tratamiento consiga negativizar la PCR en sangre para que se desarrolle una respuesta celular. El objetivo del tratamiento sería disminuir la carga parasitaria lo suficiente para que la propia respuesta celular específica del huésped controle la infección. Por tanto, el objetivo del tratamiento debe ir más allá de la curación clínica, buscando negativizar la PCR, y como consecuencia, confiar en el desarrollo de la respuesta inmune celular.

Considerando este objetivo y en base a las definiciones que hemos comentado previamente, existirían varios tipos de tratamiento (Tabla 2):

- **Tratamiento inicial o de inducción:** se inicia tras el diagnóstico. Sería el tratamiento «estándar» al que se refieren las pautas habituales. Al terminarlo debemos haber alcanzado «curación clínica inicial» y negativizar la PCR en sangre.
  - Hipótesis: Disminuir carga parasitológica al máximo permitiría el desarrollo de respuesta celular propia.
  - Series de casos han encontrado (43-45):
    - PCR negativa asociado a menor riesgo de recaída.
    - PCR persistentemente positivas asociadas a recaídas, a mayor cifra más riesgo.
- **Extensión de tratamiento vs tratamiento de rescate:** se plantearía en el contexto de fracaso de tratamiento. Es decir, el paciente sigue sintomático tras completar el tratamiento de inicial o de inducción. Para manejar esta situación se han propuesto dos opciones desde el Guidelines Development Group (GDG) de la OMS, sin mayor evidencia que la lógica y el sentido común (46).
  - En caso de observar cierta respuesta, pero incompleta, se puede optar por una «**extensión del tratamiento**», es decir, prolongar el mismo tratamiento, dando alguna dosis extra de anfotericina hasta conseguir la curación clínica inicial y, en nuestra experiencia, la negativización de PCR.
  - Por el contrario, si no se consiguió ningún tipo de mejoría con el tratamiento inicial, se plantearía un «**tratamiento de rescate**». Se asumiría que podría haber resistencia al fármaco empleado y habría que optar por otro fármaco o por una combinación de fármacos. En mi opinión, este

«tratamiento de rescate» debe plantearse siempre si la qPCR (PCR cuantitativa) no ha disminuido de forma significativa tras un tratamiento de inducción o de una recaída, debería idealmente estar basado en test de resistencias previas si están disponibles, y deberían usarse combinaciones para intentar conseguir negativizar PCR.

- **Tratamiento de recaídas:** En este escenario se asume que hubo una respuesta inicial que no consiguió curar al paciente por su inmunodepresión, pero no hay resistencia a fármacos, y por tanto se podría optar por un «**retratamiento**» con el mismo fármaco y esquema que se usó para el tratamiento inicial o de inducción. En mi opinión, si no se consiguió un descenso relevante de la qPCR con el primer tratamiento de inducción, debería plantearse en este escenario un «**tratamiento de rescate**», probablemente un tratamiento combinado, con el objetivo de negativizar la PCR.
- **Tratamiento de mantenimiento, supresor o profilaxis secundaria:** Este tipo de tratamiento está recomendado en las guías actuales tras la finalización del tratamiento inicial o de inducción en los pacientes con co-infección por VIH y *Leishmania* (1). Varios ensayos demostraron en la era pre-TARGA que se disminuía la frecuencia de recaída clínica a corto plazo (47-49). Sin embargo, la experiencia clínica ha demostrado que en el contexto de una «LV crónica activa», este esquema de tratamiento no es eficaz para evitar las recaídas ni consigue negativizar la PCR, acumulando toxicidad de forma progresiva a lo largo de los años. El tratamiento supresor en este escenario es insuficiente para conseguir la curación, y se considera un tratamiento paliativo (33).

En nuestra experiencia, el tratamiento de mantenimiento o supresor debería plantearse sólo en los escenarios de «asintomático no respondedor», y su objetivo sería mantener suprimido el parásito hasta desarrollar respuesta celular específica propia, lo que no siempre se consigue. Pero, sobre todo, este tratamiento no sería necesario si el paciente desarrolló respuesta celular tras el tratamiento inicial o de inducción, es decir, si es una «asintomático respondedor». Estos pacientes fueron capaces de controlar *Leishmania* tras el tratamiento de inducción sin necesidad de tratamiento supresor en nuestra pequeña serie de casos (37).

## Esquema de manejo práctico. Pautas recomendadas

### Antes del inicio de tratamiento

Debe ponerse especial interés en evitar la nefrotoxicidad: suspender fármacos nefrotóxicos o que favorezcan la hipopotasemia, y asegurar hidratación adecuada.

- Determinación basal (el día de inicio de tratamiento con L-AmB):
  - Hemograma, bioquímica básica con función renal y hepática, proteína C reactiva y ferritina.
  - PCR cuantitativa de *Leishmania* en sangre, para comparar respuesta antes y después del tratamiento.
  - No es necesario medir respuesta celular, que será negativa siempre.

### Tratamiento de inducción o inicial

Para planificar el tratamiento de «inducción» o inicial de la LV, debe incluirse al paciente en uno de estos tres grupos: inmunocompetente, inmunodeprimido VIH e inmunodeprimido no VIH, para los que existen diferentes pautas recomendadas y de seguimiento. Aunque la experiencia nos dice que la pauta de elección funciona en la mayoría de los pacientes, todas ellas tienen en común la falta de evidencia, siendo necesarios ensayos clínicos para evaluar la dosis más adecuadas de L-AmB en nuestro medio, y sobre todo para comparar la monoterapia frente a L-AmB con la combinación con miltefosina, que permitiera disminuir dosis de ambos fármacos.

- Inmunocompetentes
  - **Pauta de elección: anfotericina B liposomal (L-AmB), 3 mg/kg/día los días 1-5, 14 y 21 (total 21 mg/kg/día).**
    - Esta pauta se basa en la experiencia en estudios abiertos realizados en la década de los 90, principalmente en niños, aunque otras dosis menores y esquemas variados se mostraron también eficaces. Sin embargo, nuestra experiencia al analizar nuestra serie de casos de forma retrospectiva mostró que uno de los factores asociados a recaída fue usar dosis inferiores a 21 mg/kg (14). De hecho, se podrían valorar dosis mayores en algunos casos particulares («extensión del tratamiento»), por ejemplo, en pacientes con lenta respuesta clínica, pacientes con PCR positiva a fin de tratamiento o en pacientes de etnia subsahariana, donde algunos indicios sugieren que el riesgo de recaída podría ser mayor (12).

- Alternativas: monoterapia con antimonio de meglumina o con miltefosina, a las dosis habituales descritas para cada fármaco.
- Situaciones especiales: L-AmB es el fármaco recomendado en gestantes (clase B), es probablemente seguro en lactancia (aunque se recomienda evitar por prudencia). Es el único fármaco utilizable en caso de insuficiencia renal, diálisis e insuficiencia hepática grave, sin modificar las dosis. Los antimoniales están contraindicados en todos estos escenarios, y para la miltefosina faltan datos.
- **Coinfección LV-VIH. Pauta de elección: L-AmB 4 mg/kg/día los días 1-5, 10, 17, 24, 31, 38 (40 mg/kg/dosis total).**
  - Varios ensayos clínicos abiertos en los 90 en nuestro país demostraron que anfotericina, tanto liposomal como complejo lipídico, era eficaz comparada con la clásica de antimoniales. Afortunadamente, la llegada del TARGA erradicó virtualmente la coinfección VIH-*Leishmania*, pero esto impidió avanzar en la consolidación de la evidencia de ninguna de las pautas actualmente recomendadas. Así, esta pauta de elección está basada en ensayos clínicos de *L. donovani*.
  - Alternativas:
    - L-AmB liposomal 30 mg/kg/dosis total, repartida en 10 dosis.
    - L-AmB 30 mg/kg/dosis total en 10 dosis + miltefosina 50 mg/12h durante 28 días. Este esquema se ha demostrado superior en ensayos clínicos en el este de África y Sudeste de Asia a la pauta en monoterapia, y es el actual tratamiento de elección en estas zonas geográficas, donde LV está causada por *L. donovani* (46). Permite disminuir la dosis de ambos fármacos, siendo mejor tolerada y menos nefrotóxica.
    - L-AmB a la dosis necesaria hasta conseguir PCR negativa, en monoterapia o en combinación con miltefosina.
    - Monoterapia con antimonio de meglumina o con miltefosina, a las dosis habituales descritas para cada fármaco.
    - Combinación antimoniales con miltefosina, a dosis inferiores o a las habituales.
- **Inmunodeprimidos no VIH. Pauta de elección: L-AmB 4 mg/kg/día los días 1-5, 10, 17, 24, 31, 38 (40 mg/kg/dosis total).**
  - No hay ningún tipo de evidencia sobre ninguna pauta para el manejo de este tipo de pacientes, más allá de casos aislados. Además, se incluyen en este grupo pacientes muy heterogéneos, en los que el grado de in-

munosupresión no es equiparable. Diferentes guías sugieren adoptar las recomendaciones para los pacientes VIH (1,26).

- Se debe intentar retirar la inmunosupresión hasta completar el tratamiento, lo que no siempre es posible.
- En nuestra experiencia, se pueden clasificar estos pacientes en dos grandes grupos en función del riesgo de recaída.
  - Bajo riesgo de recaída: paciente con antiTNF, con metotrexate o aquellos con posibilidad de retirada definitiva de inmunodepresión. En estos pacientes hay altas probabilidades de conseguir curación clínica y respuesta celular mantenida sin tratamiento de mantenimiento.
  - Alto riesgo de recaída: trasplantados, combinación de varios inmunosupresores, esteroides dosis altas de forma mantenida y sin posibilidad de retirada de inmunodepresión profunda. En estos escenarios hay menores probabilidades de conseguir curación clínica con respuesta celular. Además, en caso de conseguirla, ésta puede perderse. El riesgo de LV crónica activa es mayor, especialmente en trasplantados.
- Alternativas:
  - L-AmB 21 mg/kg/dosis total, esquema habitual (en pacientes con bajo riesgo)
  - L-AmB 30 mg/kg/dosis total, esquema habitual.
  - L-AmB 30-40 mg/kg/dosis total + miltefosina 28 días, esquema habitual.
  - L-AmB hasta conseguir PCR negativa, sola o en combinación.
  - Monoterapia con antimonio de meglumina o con miltefosina, a las dosis habituales o menores.

### *Monitorización de toxicidad durante administración de L-AmB*

En la mayoría de los casos se puede planificar el tratamiento en hospital de día médico. No conocemos que haya ninguna experiencia de tratamiento en régimen de hospitalización a domicilio.

Si el paciente no presenta de base alteración de la función renal y no refiere síntomas durante el tratamiento, no es imprescindible la monitorización analítica durante el tratamiento, y no es recomendada por las guías.

No obstante, en nuestro medio es costumbre realizar controles analíticos, aunque no hay consenso sobre cuándo hacerlos ni cuál es el manejo adecuado en caso de elevación de creatinina. Parece razonable hacer un control analítico tras las primeras

dos o tres dosis de L-AmB en pacientes con más de 65 años o con enfermedad renal de base. Hay que recordar que el tratamiento de elección en caso de insuficiencia renal es L-AmB, ya que no se afecta su eliminación, y que el deterioro de creatinina producido por L-AmB es transitorio tras retirar el fármaco. A priori, no hay certeza de que disminuir la dosis, administrarla en infusión continua ni espaciarla suponga un beneficio, mientras que no conseguir la dosis total recomendada sí está relacionado con el riesgo de recaída (14). Por ello, la recomendación habitual es intentar completar la dosis standard, asumiendo cierta elevación de creatinina que se normalizará al cabo de unas semanas. Tampoco hay evidencia sobre un umbral de creatinina en el que suspender o retrasar el tratamiento.

- Una propuesta de manejo práctico puede ser la siguiente:
- Tras tres dosis de L-AmB: realizar bioquímica con función renal y potasio, antes de infusión del cuarto día.
  - Si creatinina > 1.5 mg/dl plantear hidratación (suero salino antes de nueva infusión de L-AmB).
  - Si creatinina > 2 mg/dl plantear hidratación y retrasar 24-72h las dos dosis restantes de la primeras cinco.
  - Si hipopotasemia, no suspender tratamiento y administrar suplementos orales de potasio.
- El esquema de pauta semanal tras las 5 primeras dosis está pensado para que no sea necesaria monitorización analítica para completar el resto del tratamiento, que quedaría a criterio clínico.
- Habitualmente a las 4-8 semanas la función renal se ha normalizado volviendo a niveles basales.

#### *Monitorización fin de tratamiento. Decisión sobre extensión de tratamiento, tratamiento supresor o tratamiento de rescate*

Al llegar al final de tratamiento de inducción, con la última dosis de L-AmB, si el paciente se ha quedado asintomático, se descarta fracaso del tratamiento y se considera curación clínica inicial. El paciente ha recuperado peso, las citopenias suelen estar resueltas, la proteína C-reactiva normalizada y la ferritina en descenso. La esplenomegalia y los títulos cuantitativos de serología disminuirán lentamente en los meses siguientes al final de tratamiento, aunque a veces no llegan a normalizarse y no son útiles para la monitorización de la respuesta. No se recomienda repetir el aspirado de médula ósea como test de cura.

Nuestra práctica es completar esta valoración clínica con la evaluación de la respuesta parasitológica e inmunológica, en torno a las 4 semanas de la última dosis de L-AmB. El objetivo tras el tratamiento de inducción debe ser no solo conseguir la curación clínica, sino negativizar la PCR:

- Hemograma, bioquímica básica con función renal y hepática, proteína C reactiva y ferritina.
- PCR cuantitativa de *Leishmania* en sangre.
- Biomarcadores inmunológicos (CPA-SLA, IFN $\gamma$ ).

Con estos resultados clasificamos al paciente como respondedor, no respondedor o portador ([Tabla 2](#)) y en función de su estatus inmunológico inmunocompetente, inmunodeprimido VIH, inmunodeprimido no VIH), se puede apoyar la toma de decisiones sobre necesidades de nuevos tratamientos:

- Inmunocompetentes: se asume que la inmunidad celular frente a *Leishmania* se recupera de forma estable tras el tratamiento, y el riesgo de recaída es muy bajo, en torno a un 5%, y de fácil solución con retratamiento. Por este motivo no es imprescindible monitorizar con los biomarcadores en este tipo de pacientes, aunque pueden aportar información para vigilar al paciente con mayor riesgo de recaída, por ejemplo, subsaharianos.
  - Asintomático respondedor: No precisaría más tratamiento por el momento, independientemente de sus estatus inmunológico.
  - Asintomático no respondedor: Se puede valorar prolongar el tratamiento (tratamiento extendido) y/o iniciar tratamiento supresor.
  - «Portador» asintomático: tratamiento de rescate y reevaluar biomarcadores tras el mismo.
- Inmunodeprimidos VIH: se asume que la inmunidad celular frente a *Leishmania* es potencialmente recuperable de forma estable en aquellos pacientes que inician TARGA. Es esencial asegurar TARGA eficaz durante todo el tratamiento que mantenga carga viral HIV indetectable y permita recuperación progresiva de los niveles de CD4, especialmente «el» CD4 específico frente a *Leishmania*. Los biomarcadores son esenciales para el manejo de estos pacientes tras el tratamiento de inducción ([Tabla 2](#)):
  - «Asintomático respondedor»: No precisa tratamiento supresor y se puede monitorizar con el mismo esquema que los inmunocompetentes, incluyendo siempre los biomarcadores. Mantener una respuesta celular específica frente a *Leishmania* se ha mostrado como factor protector independiente que se asocia a ausencia de recaídas ([37,42](#)). Esta respuesta se suele asociar

a una recuperación de las cifras de CD4. Si además se mantienen niveles de CD4 superiores a 350 de forma sostenida, no se precisa seguimiento específico más allá del año, como los inmunocompetentes. Los curados respondedores con menos de 350 CD4 no precisan tratamiento supresor, pero parece razonable prolongar el seguimiento con biomarcadores a largo plazo.

- «Asintomático no respondedor»: sería candidato a tratamiento supresor, y se monitoriza de forma indefinida hasta confirmar que presenta respuesta o recaída clínica.
- «Portador asintomático»: es más frecuente en pacientes que parten de CD4 bajos, y debe considerarse y tratarse como una «LV crónica activa», que es preciso manejar de forma específica.
- Inmunodeprimidos no VIH: Se asume que la inmunidad sólo es recuperable de forma estable en los pacientes en los que es posible retirar la inmunosupresión. Pero, en la mayoría de los casos, la inmunidad es probablemente fluctuante, y su grado de inmunidad depende de la potencia de la inmunosupresión, muy variable y dependiente de la enfermedad de base. Esto hace que los resultados de los biomarcadores inmunológicos puedan variar a lo largo del tiempo y no pueden tomarse en ningún caso como definitivos. No obstante, son una herramienta más de apoyo a la toma de decisiones en estos pacientes tras el tratamiento de inducción (Tabla 2). Como comentamos previamente, es importante distinguir los pacientes con bajo riesgo de recaída, cuyo manejo es más semejante a los inmunocompetentes, de los de alto riesgo:
  - «Asintomático respondedor»: No precisa tratamiento supresor en ningún caso y se puede monitorizar con el mismo esquema que los inmunocompetentes, incluyendo siempre los biomarcadores. Se podría reintroducir la inmunosupresión en aquellos casos en los que se retiró y sea imprescindible. Los pacientes de bajo riesgo no precisarían seguimiento específico más allá del año, como los inmunocompetentes, si mantienen su estatus de asintomático respondedor. En los de alto riesgo parece razonable prolongar el seguimiento con biomarcadores a largo plazo. La fiabilidad de los biomarcadores es menor que en los pacientes VIH o inmunocompetentes, por lo que la monitorización clínica es fundamental.
  - «Asintomático no respondedor»: sería candidato a tratamiento supresor, e idealmente se debería retrasar la introducción de la inmunosupresión.

Se monitoriza de forma indefinida hasta confirmar que presenta respuesta o recaída clínica.

- «Portador asintomático»: es típica de pacientes de alto riesgo, y debe considerarse y tratarse como una «LV crónica activa».

### Seguimiento tras tratamiento

En todos los casos, independientemente del estatus inmunológico y de la respuesta al tratamiento de inducción, es recomendable prolongar el seguimiento hasta 1 año tras el fin de tratamiento, ya que las recaídas se producen mayoritariamente en este período, especialmente los primeros 6 meses.

- Nuestra práctica habitual es una revisión clínica y analítica cada 2-3 meses en este primer año, que incluiría las mismas pruebas que tras el fin de tratamiento de inducción:
  - Hemograma, bioquímica básica con función renal y hepática, proteína C reactiva y ferritina.
  - PCR cuantitativa de *Leishmania* en sangre.
  - Biomarcadores inmunológicos (CPA-SLA, IFN $\gamma$ ).
- Es importante asesorar al paciente para que consulte de forma precoz en caso de notar reaparición de los síntomas en cualquier momento.
- La duración del seguimiento debe ser individualizada, pero a grandes rasgos podemos aconsejar:
  - Probablemente no es necesario prolongar más de un año en asintomáticos respondedores que sean inmunocompetentes, inmunodeprimidos VIH con más de 350 CD4 o inmunodeprimidos no VIH con perfil de bajo riesgo (antiTNF, metotrexate, retirada definitiva de inmunodepresión tras el tratamiento)
  - Probablemente debe ser indefinida en el resto de los casos: todos los asintomáticos no respondedores, y los asintomáticos respondedores VIH con menos de 350 CD4 o inmunodeprimidos no VIH con perfil de alto riesgo (trasplantados, combinación de varios inmunosupresores, esteroides dosis altas, inmunodepresión indefinida).

### Manejo de fracaso de LV crónica activa. Tratamientos de rescate

La estrategia más empleada para manejar a estos pacientes es mantener al paciente con tratamiento supresor indefinido y tratar las esperables recaídas clínicas

con esquemas de retratamiento o tratamientos de rescate, pero no existen evidencias para ello más allá de recomendación de expertos. Además, las guías actuales consideran esta situación como incurable, y el paciente candidato a tratamiento paliativo (26,46), lo que demuestra que esta práctica habitual es sin duda un punto clave a mejorar. Esta situación ocurre en pacientes con inmunodepresión avanzada incapaces de montar una respuesta específica frente a *Leishmania* que controle la infección. Son imprescindibles estudios básicos que ayuden a mejorar la inmunidad de estos pacientes, y ensayos con pautas de manejo alternativas a la actual.

Mientras tanto, el manejo de estos pacientes se basa en la individualización y el sentido común del clínico. Aporto algunas ideas y conceptos que pueden ayudar a definir los esquemas de tratamiento supresor y retratamiento en este escenario, sin ninguna evidencia más allá de mi experiencia:

- No se conseguirá desarrollar una respuesta celular específica a *Leishmania* mientras la PCR en sangre sea persistentemente positiva. Por ello, el primer paso es intentar diseñar una pauta potente que negativice la misma.
- Si la PCR se mantiene positiva tras el tratamiento, el tratamiento supresor no conseguirá más que, como mucho, prolongar el tiempo entre recaídas. Probablemente es mejor opción plantear retratamiento o tratamiento de rescate, y reservar el tratamiento supresor para cuando se haya conseguido una PCR negativa, con idea de mantener dicha PCR suprimida mientras se intenta optimizar la inmunidad del huésped para ver si consigue desarrollar su propia respuesta.
- En pacientes trasplantados, retirar el trasplante puede ser la única posibilidad de optimizar la inmunidad del huésped. En los pacientes VIH esto pasa por controlar la carga viral con TARGA.
- Comparar qPCR cuantitativa leishmania antes y después de una pauta de tratamiento es un dato indirecto de la eficacia del tratamiento que nos puede ayudar a decidir qué fármacos emplear en los tratamientos de rescate:
  - Si hay un descenso relevante, se puede reutilizar el mismo fármaco para un tratamiento extendido y/o añadir segundo fármaco de primera línea en tratamiento combinado hasta conseguir PCR negativa.
  - Si no hay un descenso relevante, hay que plantearse:
    - Hacer test de resistencias.
    - Tratamiento de rescate combinado introduciendo uno o dos fármacos nuevos, dependiendo del nivel de descenso.

- Opciones de fármacos de segunda línea: pentamidina, paramomicina, fluconazol.
- Probablemente sea mejor opción usar pautas con tratamientos en combinación con dosis menores que eviten toxicidad, especialmente en el caso de los antimoniales.
- Para las pautas de tratamiento supresoras, se puede optar por fármacos orales (por ejemplo miltefosina combinado con fluconazol) y reservar los antimoniales y L-AmB para los tratamientos de rescate.
- Se debe monitorizar al paciente con los biomarcadores parasitológicos e inmunológicos cada 3-4 meses. Si en algún momento se demuestra respuesta inmunológica, es decir, «asintomático respondedor», se puede retirar cualquier tratamiento. Aunque esta situación no asegura la curación definitiva, permite ahorrar fármacos y, al menos, toxicidad.

#### LV. Futuro. Mucho por hacer

Los biomarcadores han demostrado que pueden ser de gran utilidad para el seguimiento y toma de decisiones en algunos escenarios de LV. Es esencial determinar cuál es el mejor biomarcador inmunológico, que éste sea sencillo y práctico para poder ser realizado en laboratorios de baja complejidad tecnológica y para poder estandarizar su uso en todos los territorios donde LV es endémica. Además, nuestra experiencia en el manejo de estos biomarcadores se basa en casos aislados y debe tomarse con precaución, es necesario consolidar su evidencia en ensayos clínicos o al menos en series más amplias.

No hay evidencia consistente sobre las pautas de elección actuales recomendadas para el manejo de LV por *L. infantum*, ni del papel de las pautas combinadas, que ya se han mostrado mejores para *L. donovani*. Es necesario promover redes de colaboración para recogida de información del manejo de estos pacientes en nuestro entorno, e idealmente para el posterior desarrollo de ensayos clínicos multicéntricos tanto en pacientes inmunocompetentes como VIH e inmunodeprimidos no VIH. Se debe comparar la pauta de inmunodeprimido de L-AmB actualmente recomendada (40 mg/kg dosis total) con los esquemas de inmunocompetente y con tratamientos combinados con miltefosina. Se debe consolidar la evidencia de manejo de los «curados respondedores», que no precisarían tratamiento incluso en pacientes VIH. Se debe investigar para conseguir la curación de los pacientes con LV crónica activa, considerados actualmente incurables. En definitiva, queda mucho por hacer en el campo del tratamiento de la LV.

## BIBLIOGRAFIA

1. L. Gradoni, R. López-Vélez, M. Mokni, Publication date: 5 July 2017, Languages: English, ISBN: 978 92 89052 51 1, WHO reference number: WHO | Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region [Internet]. 2017 [citado 22 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789289052511>
2. Ignatius R, Loddenkemper C, Woitzik J, Schneider T, Harms G. Localized Leishmanial Lymphadenopathy: An Unusual Manifestation of Leishmaniasis in a Traveler in Southern Europe. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. agosto de 2011 [citado 21 de septiembre de 2023];11(8):1213-5. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2011.0642>
3. Horrillo L, San Martín JV, Molina L, Madroñal E, Matía B, Castro A, *et al.* Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* marzo de 2015;21(3):269-73.
4. Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA, Khidir S. Visceral leishmaniasis in Sudan. Clinical features. *Trop Geogr Med.* abril de 1990;42(2):107-12.
5. Sihuay D, Gornals JB, Saumoy M, Baixeras N, Sánchez A, Consiglieri CF, *et al.* Visceral leishmaniasis with mediastinal lymphadenopathy diagnosed with endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration. *Rev Espanola Enfermedades Dig Organo Of Soc Espanola Patol Dig.* noviembre de 2016;108(11):736-8.
6. Sousa A de Q, Parise ME, Pompeu MM, Coehlo Filho JM, Vasconcelos IA, Lima JW, *et al.* Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* octubre de 1995;53(4):380-5.
7. Azadeh B, Sells PG, Ejeckam GC, Rampling D. Localized *Leishmania* lymphadenitis. Immunohistochemical studies. *Am J Clin Pathol.* julio de 1994;102(1):11-5.
8. Gaafar A, Ismail A, Kadaró AYE, Hashim E, Khalil E a. G, Hassan AME. Necrotizing and suppurative lymphadenitis in *Leishmania* major infections. *Trop Med Int Health* [Internet]. 1996 [citado 4 de mayo de 2022];1(2):243-50. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3156.1996.tb00034.x>

9. Daneshbod Y, Daneshbod K, Khademi B, Negahban S, Bedayat GR. New cytologic clues in localized *Leishmania* lymphadenitis. *Acta Cytol.* octubre de 2007;51(5):699-710.
10. Kumar PV, Moosavi A, Karimi M, Safaei A, Noorani H, Abdollahi B, *et al.* Subclassification of localized *Leishmania* lymphadenitis in fine needle aspiration smears. *Acta Cytol.* agosto de 2001;45(4):547-54.
11. Dabiri S, Safavi M, Shamsi Meymandi S, Yousefi K, Shamsi Meymandi M, Fotouhi Ardakani R, *et al.* Molecular pathology and histopathological findings in localized leishmania lymphadenitis. *Arch Iran Med.* febrero de 2014;17(2):122-6.
12. Horrillo Sánchez de Ocaña L. Características clínicas, diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis visceral en pacientes adultos inmunocompetentes. Leishmaniasis ganglionar como forma atípica de presentación. Experiencia del brote epidémico de Fuenlabrada. Tesis Dr Univ Rey Juan Carlos [Internet]. 2019 [citado 21 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://eciencia.urjc.es/handle/10115/16598>
13. Aoun K, Ben Romdhane N, Bouratbine A, Limam F. [Isolated adenopathy in leishmaniasis due to *Leishmania infantum*]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. 21 de diciembre de 2002;31(40):1890-2.
14. Horrillo L, Castro A, Matía B, Molina L, García-Martínez J, Jaqueti J, *et al.* Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned? *Parasit Vectors* [Internet]. 24 de julio de 2019 [citado 21 de septiembre de 2023];12:359. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6657057/>
15. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(3):191-9.
16. Santana IU, Dias B, Nunes EAS, Rocha FAC da, Silva FS, Santiago MB. Visceral leishmaniasis mimicking systemic lupus erythematosus: Case series and a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. junio de 2015 [citado 4 de noviembre de 2018];44(6):658-65. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049017214003278>
17. Henter JI, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, *et al.* HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* febrero de 2007;48(2):124-31.

18. Martín A, Marques L, Soler-Palacín P, Caragol I, Hernandez M, Figueras C, *et al.* Visceral leishmaniasis associated hemophagocytic syndrome in patients with chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis J.* agosto de 2009;28(8):753-4.
19. Blázquez-Gamero D, Domínguez-Pinilla N, Chicharro C, Negreira S, Galán P, Pérez-Gorricho B, *et al.* Hemophagocytic lymphohistiocytosis in children with visceral leishmaniasis. *Pediatr Infect Dis J.* junio de 2015;34(6):667-9.
20. Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, Lachaud L. «Active chronic visceral leishmaniasis» in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients: Active chronic visceral leishmaniasis. *HIV Med* [Internet]. noviembre de 2010 [citado 21 de abril de 2018];11(10):670-3. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1293.2010.00846.x>
21. Casado JL, Cuesta C, Sanchez JA, Guerrero A. Solitary pulmonary nodule due to *Leishmania* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1998;532-4.
22. Perrin-Terrin A, Auriol S, Mahieu L, Debard A, Eden A, Cassagne M, *et al.* Uvéite antérieure bilatérale récidivante à *Leishmania infantum* chez un patient présentant un déficit immunitaire lié à une infection à VIH : à propos d'un cas et revue de la littérature. *J Fr Ophtalmol* [Internet]. 1 de septiembre de 2014 [citado 22 de febrero de 2023];37(7):514-9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0181551214002058>
23. Soria López E, Olalla Sierra J, Del Arco Jiménez A, Pereda Salguero T, Abitei C, de la Torre Lima J. Colonic leishmaniasis in a patient with HIV: a case report. *Rev Espanola Enfermedades Dig Organo Of Soc Espanola Patol Dig.* diciembre de 2016;108(12):838-40.
24. Ortiz M, Mon C, Herrero JC, Olié A, Rodríguez I, Ortega O, *et al.* Glomerulonephritis and cryoglobulinemia: first manifestation of visceral leishmaniasis. *Clin Nephrol.* junio de 2015;83(6):370-7.
25. Bermejo Rodríguez A, Ruiz Giardin JM, Garcia Martinez J, San Martin Lopez JV, Castaneda de la Mata A, Lopez Lacomba D, *et al.* Diagnostic model of visceral leishmaniasis based on bone marrow findings. Study of patients with clinical suspicion in which the parasite is not observed. *Eur J Intern Med.* noviembre de 2019;69:42-9.
26. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March

- 2010 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2010. 186 p. (WHO technical report series). Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf;jsessionid=92DC989D367A1E7AD2FA0A7E8A56FB90?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=92DC989D367A1E7AD2FA0A7E8A56FB90?sequence=1)
27. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. *Drugs* [Internet]. noviembre de 2013 [citado 21 de abril de 2018];73(17):1863-88. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s40265-013-0133-0>
28. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 de mayo de 2015;60(9):1398-404.
29. Dorlo TPC, Huitema ADR, Beijnen JH, de Vries PJ. Optimal Dosing of Miltefosine in Children and Adults with Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. julio de 2012 [citado 25 de septiembre de 2023];56(7):3864-72. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3393397/>
30. Marovich MA, Rosalia L, Marc S, Fuchs GH, Kruezer R, Nutman TB, *et al.* Leishmaniasis Recidivans Recurrence after 43 Years: A Clinical and Immunologic Report after Successful Treatment. *Clin Infect Dis* [Internet]. 1 de octubre de 2001 [citado 25 de septiembre de 2023];33(7):1076-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1086/322643>
31. New D, Rogers BA. Case Reports: Late Emergence of Cutaneous Leishmaniasis in an Immunocompromised Patient in a Non-Endemic Setting. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. enero de 2019 [citado 25 de septiembre de 2023];100(1):115-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6335897/>
32. Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, Lachaud L. «Active chronic visceral leishmaniasis» in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med*. noviembre de 2010;11(10):670-3.
33. WHO guideline for the treatment of visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in East Africa and South-East Asia [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2022 [citado 25 de septiembre de 2023]. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581531/>

34. van Griensven J, Mengesha B, Mekonnen T, Fikre H, Takele Y, Adem E, *et al.* Leishmania Antigenuria to Predict Initial Treatment Failure and Relapse in Visceral Leishmaniasis/HIV Coinfected Patients: An Exploratory Study Nested Within a Clinical Trial in Ethiopia. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:94.
35. Bhattacharyya T, Ayandeh A, Falconar AK, Sundar S, El-Safi S, Gripenberg MA, *et al.* IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in Visceral Leishmaniasis, and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 23 de octubre de 2014 [citado 25 de septiembre de 2023];8(10):e3273. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003273>
36. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2008;21(2):334-59, table of contents.
37. Castro A, Carrillo E, San Martín JV, Botana L, Molina L, Matía B, *et al.* Lymphoproliferative response after stimulation with soluble leishmania antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients. *Acta Trop.* diciembre de 2016;164:345-51.
38. Botana L, Matía B, San Martín JV, Romero-Maté A, Castro A, Molina L, *et al.* Cellular Markers of Active Disease and Cure in Different Forms of *Leishmania infantum*-Induced Disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:381.
39. Botana L, Ibarra-Meneses AV, Sánchez C, Castro A, Martín JVS, Molina L, *et al.* Asymptomatic immune responders to Leishmania among HIV positive patients. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 3 de junio de 2019 [citado 25 de septiembre de 2023];13(6):e0007461. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007461>
40. Molina R, Jiménez M, García-Martínez J, Martín JVS, Carrillo E, Sánchez C, *et al.* Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 23 de abril de 2020 [citado 25 de septiembre de 2023];14(4):e0008253. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008253>
41. Carrillo E, Carrasco-Antón N, López-Medrano F, Salto E, Fernández L, San Martín JV, *et al.* Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to Leishmania, and for Confirming Cure from Leishmaniasis, in Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):e0004179.

42. Takele Y, Mulaw T, Adem E, Shaw CJ, Franssen SU, Womersley R, *et al.* Immunological factors, but not clinical features, predict visceral leishmaniasis relapse in patients co-infected with HIV. *Cell Rep Med.* 18 de enero de 2022;3(1):100487.
43. Verrest L, Kip AE, Musa AM, Schoone GJ, Schallig HDFH, Mbui J, *et al.* Blood Parasite Load as an Early Marker to Predict Treatment Response in Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* [Internet]. 13 de febrero de 2021 [citado 23 de septiembre de 2021];73(5):775-82. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8423463/>
44. Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1 de mayo de 2008;48(1):13-9.
45. Molina I, Fisa R, Riera C, Falcó V, Elizalde A, Salvador F, *et al.* Ultrasensitive Real-Time PCR for the Clinical Management of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 10 de julio de 2013 [citado 12 de diciembre de 2019];89(1):105-10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748463/>
46. WHO guideline for the treatment of visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in East Africa and South-East Asia [Internet]. 2022 [citado 10 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240048294>
47. Laguna-del-Estal P, Moya-Mir MS. PROPHYLAXIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED. *BMJ.* 1985;291:1611.
48. López-Vélez R, Videla S, Márquez M, Boix V, Jiménez-Mejías ME, Górgolas M, *et al.* Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother.* marzo de 2004;53(3):540-3.
49. Molina I, Falcó V, Crespo M, Riera C, Ribera E, Curran A, *et al.* Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de octubre de 2007 [citado 28 de febrero de 2019];60(4):837-42. Disponible en: <https://academic.oup.com/jac/article/60/4/837/713621>

## CAPÍTULO 3

# Manejo clínico de la leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucosa por *Leishmania Infantum* en España

### Begoña Monge-Maillo

Unidad de Referencia Nacional para Enfermedades Tropicales. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid.

CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III. Centro Colaborador de la OMS en el manejo clínico de la leishmaniasis.

## EPIDEMIOLOGIA

La leishmaniasis cutánea (LC) consiste en la lesión que característicamente se desarrolla en el lugar donde el flebotomo infectado inocula los promastigotes. La LC ha recibido numerosos nombres, el más conocido es el de botón de Oriente, pero también otros como úlcera de Oriente, botón de Biskra, botón de Alepo, forúnculo de Jericó, forúnculo de Delhi, salek («año corto», en Irán), al okht («la hermanita», en Arabia Saudí) o úlcera de chiclero en América Central y del Sur.

Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que se producen al año de 600.000 a 1 millón de nuevos casos de LC, siendo considerada la forma de presentación de leishmaniasis más frecuente. El 95% de los casos de LC se localizan en América, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central (1,2). En el año 2020 el 80% de los casos se concentraban en 7 países : Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Irak, Pakistán y la República Siria (3). A pesar de los datos disponibles, existe una importante infra notificación de casos de LC. Esto probablemente se deba, entre otros factores, al curso habitualmente benigno de la LC lo que supone una menor solicitud de asistencia médica y que sea excepcional la necesidad de hospitalización, por lo que el registro de casos es más complejo que en la leishmaniasis visceral.

En el área Europea de la OMS se ha estimado una incidencia anual de 10.000 a 17.000 casos de LC siendo los países más afectados Turquía, Israel, Tayikistán, Turkmenistán y Uzbekistán. Pero casos de LC autóctonos se han reportado también

en otros países incluyendo Albania, Armenia, Azerbaiyán, Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Croacia, Chipre, Francia, Georgia, Grecia, Italia, Kazajstán, Kirguistán, Malta, Mónaco, Montenegro, Portugal, Eslovenia, España y la República Yugoslava de Macedonia. En el sur de la Unión Europea y área de los Balcanes la mayoría de los casos de LC están causados por *L. infantum*, aunque se han descrito también casos por *L. tropica* en Grecia. En Chipre se ha identificado también *L. donovani* como causante de LC. En Turquía, los agentes causales son *L. tropica* en el sureste de Anatolia, *L. tropica* o *L. infantum* en el Mediterráneo oriental y *L. infantum* en la costa del Egeo. En Israel, históricamente el principal agente de CL ha sido *L. major*; aunque se han reportado casos por *L. tropica* en el centro y norte del país (4).

Concretamente en España, entre 2019 y 2021, la Red nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAV) declaró 1.041 casos autóctonos de leishmaniasis. De los 932 casos con información disponible sobre su categoría clínica, 479 (51,4%) fueron casos de leishmaniasis cutánea o mucocutánea siendo esta proporción superior en determinadas Comunidades Autónomas como Baleares (84,3%), Cataluña (69,0%), Murcia (55,1%) y la Comunidad Valenciana (53,5%) (5). La leishmaniasis en España está causada por *Leishmania infantum* y transmitida *Phlebotomus ariasi* y *P. perniciosus* con una transmisión zoonótica y siendo los perros el reservorio principal (1,2).

## MANIFESTACIONES CLINICA

### Leishmaniasis cutánea

La LC se manifiesta por la aparición de una o más lesiones generalmente ulcerosas no dolorosas en áreas descubiertas del cuerpo, especialmente la cara, el cuello, los brazos y las piernas. Los signos y síntomas clínicos de LC pueden diferir según el agente causal y generalmente siguen un patrón similar dentro de un área geográfica y se ven modificados también por la situación inmunológica del paciente (6).

Se ha descrito que la LC se presenta con mayor frecuencia en la infancia. Esto podría deberse a una inmadurez del sistema inmunológico, a una exposición más prolongada al vector o una mayor facilidad para penetrar la piel por parte del vector y por tanto una mayor facilidad para la inoculación del parásito (7,8). Los datos publicados en series españolas sobre LC son heterogéneos con respecto a la incidencia en niños. Un estudio realizado en Granada encontró que el 56% de los pacientes eran menores de 5 años (9) pero en otro llevado a cabo en Madrid sólo un 38% de pacientes eran menores de 12 años (10). Otros trabajos realizados en Toledo, Madrid (Fuenlabrada) y Mallorca presentaron también bajos porcentajes de niños entre los casos reportados de LC siendo estos de un 38%, 30% y 23% respectivamente (7,8,11).

En cuanto al género, en diferentes series publicadas en España parece haber una discreta predominancia de los casos de LC en mujeres. Un estudio que recoge casos de LC en Madrid entre 1981 y 1989, reporta que el 54,8% de ellos se dieron en mujeres (10). Esta diferencia fue mucho mayor en un estudio realizado en Toledo donde el 70% de los pacientes con LC eran mujeres (7). Del mismo modo un estudio realizado en un Hospital de Mallorca entre 2013 y 2017 se encontró que un 52% de los casos de LC se diagnosticaron en mujeres (11). Por el contrario, esta predominancia de mujeres no se describió en el brote de Fuenlabrada donde supusieron el 48% de los casos (8).

Las lesiones de la LC generalmente se inician con una pápula eritematosa asintomática o poco pruriginosa en el lugar de la inoculación que puede evolucionar tras un periodo variable de una semana a meses a una lesión típica de LC. La duración del periodo de incubación depende de diversos factores como la especie de *Leishmania*, la cantidad de parásito inoculado, de la respuesta inmune del huésped, y de posibles exposiciones previas. Se han descrito que estos periodos son más cortos en visitantes a áreas endémicas que en aquellos que residen de forma permanente en dichas zonas (12). En el caso de *L. infantum* se han reportado periodos de incubación de hasta 8-9 meses (6).

La lesión típica comienza inicialmente como una placa de color rojizo oscuro que va infiltrando progresivamente y aumentando de tamaño. Posteriormente la superficie va adquiriendo escamas que al cabo de uno o dos meses se convierte en una lesión nodular sobre una placa infiltrada en profundidad. El centro puede presentar un exudado seropurulento que acaba formando una costra firmemente adherida. En este punto es cuando a la lesión se la denomina «Botón de Oriente». Al desprenderse la costra la lesión se presenta como una úlcera de bordes elevados y fondo irregular cubierto por un exudado seropurulento (12). Generalmente las lesiones por *L. infantum* suelen alcanzar un diámetro de 2 a 8 cm(6). En esta situación la lesión puede permanecer durante varias semanas e incluso meses. Posteriormente, la secreción cesa y comienza la regresión y reparación de la lesión a partir del centro, hacia el exterior, en un tiempo variable. Finalmente, la lesión concluye con la formación de una cicatriz lisa o rugosa, deprimida, hiper o hipocrómica (12) (Figura 1, 2 y 3).

**Figura 1. Lesión incipiente.**



**Figura 2. Lesión típica.**



**Figura 3. Lesión curada cicatricial.**



Hasta en un 10% de los casos de LC se han descrito sobreinfecciones bacterianas de las lesiones especialmente de aquellas ulceradas, pudiendo asemejarse a lesiones por impétigo y exacerbando los síntomas de la LC (6). En ocasiones la forma de presentación puede ser diversa y cursar como lesiones papulares, acneiformes, nodulares, eczematiformes, en placas, hiperqueratósicas, verrugosas o papilomatosas (12).

Habitualmente los pacientes suelen cursar con una lesión única, pero pueden también presentar lesiones múltiples. Se han descrito tres posibles fenómenos etiopatogénicos en el desarrollo de lesiones múltiples. En primer lugar, la inoculación por múltiples picaduras repetidas de un mismo flebotomo; en segundo lugar, la posible diseminación del parásito a través de las células del sistema inmune debido a una alta carga parasitaria; y, en tercer lugar, como consecuencia de una reacción alérgica por diseminación de material antigénico sin evidencia de parásitos vivos en las lesiones. En distintas series de casos de LC en España se ha observado como la mayoría de los pacientes cursan con una única lesión cutánea más que con lesiones múltiples (7,9,11,13). Sin embargo, en el brote de leishmaniasis declarado en Madrid entre 2010 y 2012, los datos muestran un predominio de casos de pacientes con lesiones múltiples (8).

Existen otras formas de presentación que no son características de LC por *L. infantum* pero que se mencionan brevemente por la posibilidad de casos aislados autóctonos y sobre todo por la posibilidad de casos de LC importada (4).

- Leishmaniasis cutánea con linfangitis nodular: Esta forma de LC es poco común en la región europea. Los nódulos subcutáneos suelen ser eritematosos, indoloros y proximales a las lesiones cutáneas primarias. Cuando son múltiples, a menudo muestran una configuración lineal.
- Leishmaniasis cutánea recidivante: También conocida como leishmaniasis lupoide o tuberculoide, se asocia casi exclusivamente con la infección por

*L. tropica*. Las lesiones características son papulares y pueden aparecer meses o años después de la curación de la LC. Se suelen localizar en o alrededor, de la cicatriz de la LC previa. En ocasiones la leishmaniasis recidivante puede persistir durante años.

- Leishmaniasis cutánea difusa: Esta forma de presentación parece estar ligada casi exclusivamente a la infección *L. aethiopica* en Etiopía y Kenia. Comienza como una lesión nodular localizada que no se ulcera. La expansión de los amastigotes por los macrófagos a través de la piel genera la aparición de nódulos o placas cutáneas diseminadas que contienen abundante parasitemia. Cuando aparecen en la cara o las orejas pueden causar una facies leonina que hace necesario el diagnóstico diferencial con la lepra lepromatosa.
- Leishmaniasis cutánea post kala-azar: Parece ser casi exclusiva de la infección por *L. donovani* en la India y África del este, aunque se han descrito casos en área del Mediterráneo por *L. infantum* (14) (Figura 4). Las lesiones aparecen como secuelas tras aproximadamente un año de haber presentado un episodio de leishmaniasis visceral curado. Es más frecuente en la India, donde se presenta en el 20% de los pacientes con LV frente al 5% en África del este. Las manifestaciones clínicas consisten en la aparición de lesiones a modo de máculas, pápulas o nódulos, con escasa tendencia a la ulceración y especialmente en cara, tronco y extremidades. En la India se han descrito también como lesiones maculares o placas hipopigmentadas asintomáticas.

**Figura 4. Lesión PKDL por *L. infantum*.**



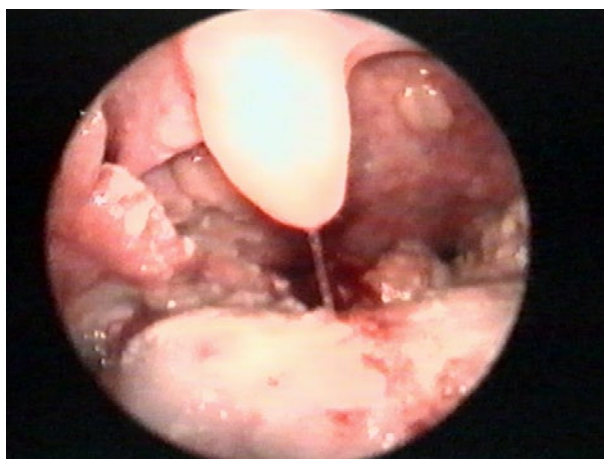
## Leishmaniasis mucosa

La leishmaniasis mucosa (LM), también conocida como espundia, ocurre fundamentalmente en el Nuevo Mundo y es causada por el subgénero *Viannia*, especialmente *LV braziliensis*, *LV guyanensis* y *LV panamensis*, pero también *LL. amazonensis*. Un pequeño porcentaje de los pacientes con lesiones cutáneas desarrollan afectación de las membranas mucosas de la nariz, cavidad bucal, faringe o laringe meses o años después de que sus lesiones cutáneas se hayan resuelto (15). Sin embargo, la afectación mucosa ocurre también en otras ocasiones como resultado de la infección por otras especies de *Leishmania*. Se han reportado casos de lesiones mucosas por expansión por contigüidad de lesiones cutáneas por *L. tropica* (16,17) y lesiones mucosas aisladas causadas por *L. donovani* (18) y por *L. infantum* (19).

Son escasas las series de leishmaniasis mucosa por *L. infantum* publicadas. Los datos disponibles ponen de manifiesto que los casos son más frecuentes en pacientes adultos varones, siendo casi la mitad de los pacientes inmunodeprimidos, mayoritariamente por VIH. A pesar de que la leishmaniasis mucosa es poco frecuente, llega a suponer el 11-13% de los casos recogidos en algunas series de leishmaniasis tegumentarias por *L. infantum* (20,19,21).

La forma de presentación de la leishmaniasis mucosa por *L. infantum* parece ser muy similar a la que se ha descrito en especies del Latino América. La localización más frecuente de las lesiones mucosas es el área naso-oro-faríngea. Pueden presentarse a modo de lesiones excrecentes orales; como úlceras en la cavidad oral, en tabique nasal o cuerdas vocales; a modo de engrosamiento extenso de mucosa nasal o de los aritenoides (Figura 5).

**Figura 5. Leishmaniasis mucosa laríngea por *L.infantum*.**



Característicamente las lesiones suelen ser indoloras y los síntomas son consecuencia del impacto que la lesión puede tener en el área anatómica afectada. De este modo las diferentes manifestaciones clínicas incluyen congestión u obstrucción nasal, sangrado de las mucosas o aumento de secreciones nasales. Cuando las lesiones son más avanzadas puede aparecer dolor, deformidad o inflamación. La presencia de erosión de las superficies mucosas es más común en la nariz, la boca o el tabique nasal (p. ej., en forma de perforación del cartílago). La presencia de ronquera y/o una tos estridente pueden darse en los casos de afectación laríngea. En ocasiones el hecho de que las lesiones sean indoloras y los síntomas muy poco específicos, junto con una baja incidencia, hace que sea frecuente un retraso diagnóstico de la LM en nuestro medio (18,19,22).

### Leishmaniasis cutánea y mucosa en pacientes inmunodeprimidos

El impacto de la inmunosupresión por la infección por VIH o derivada de tratamientos inmunosupresores está claramente descrito en pacientes con leishmaniasis visceral (23,24). La experiencia publicada sobre su efecto sobre la LC y la LM es mucho menor. Aun así se ha descrito como la coinfección por VIH afecta negativamente el curso de la LC a medida que avanza la inmunosupresión (25). Se ha reportado una mayor frecuencia de presentaciones atípicas con un polimorfismo clínico que en ocasiones dificulta el diagnóstico diferencial. Los pacientes coinfectados pueden también cursar con varias formas de presentación diferentes al mismo tiempo (por ejemplo papulo nodular, ulcerosa, difusa, queiloide entre otras) (26). La co-infección parece también causar lesiones más graves, más extensas, con peor respuesta terapéutica y retraso en la curación (25).

Variantes dermatrópicas de *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* han sido identificadas como causantes de leishmaniasis visceral en pacientes coinfectados por VIH. Del mismo modo, se ha descrito que entre un 8 a un 12% de pacientes coinfectados VIH/LV han presentado afectación cutánea aislándose especies viscerotropicas de leishmania como *L. infantum* o *L. chagasi* en las lesiones cutáneas e incluso en piel aparentemente sana (27). En el contexto de inmunosupresión por VIH se han descrito cuadros de PKDL en pacientes con LV por *L. infantum* (28,29). Menor evidencia existe sobre la LM y el VIH, pero parecen cursar con síntomas más severos y peor respuesta al tratamiento que en pacientes no coinfectados (25).

Actualmente es cada vez más frecuente el uso de fármacos biológicos para el manejo de enfermedades inflamatorias lo que está suponiendo un incremento en el número de casos de leishmaniasis asociado a la inmunosupresión que estos tratamientos producen (4). Los fármacos más directamente implicados han sido los

inhibidores del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (anti-TNF- $\alpha$ ). De entre ellos, el riesgo de leishmaniasis parece ser mayor con adalimumab e infliximab que con etanercept y certolizumab (30).

Clínicamente los pacientes con LC y LM en tratamiento con fármacos anti-TNF- $\alpha$  parecen presentar con mayor frecuencia lesiones a modo de placas con ulceración y de mayor tamaño (31). No se ha descrito hasta la fecha que los pacientes recibiendo anti TNF- $\alpha$  y LC /LM presenten un mayor riesgo progresión hacia LV (31,32). Desde el punto de vista diagnóstico, los pacientes con anti TNF- $\alpha$  presentan con mayor frecuencia una hiperplasia pseudocarcinomatosa en los estudios histológico (31).

No hay un consenso en cuanto al manejo terapéutico de la LC y LM por *L. infantum* en pacientes en tratamiento con anti TNF- $\alpha$ . Por regla general, todos los casos de LM en las series publicada han sido tratados con tratamiento sistémico, con anfotericina B liposomal como primera opción terapéutica. Sin embargo, hay más disparidad en el tratamiento de aquellos casos de LC, siendo frecuente el uso de tratamientos locales como los antimoniales intra lesionales. Sin embargo, estudios comparativos de casos de LC en pacientes con y sin tratamiento inmunosupresor se describen una mayor tendencia hacia la el tratamiento sistémico en los aquellos con anti-TNF- $\alpha$  (31).

En cuanto al manejo de los inmunosupresores, la experiencia es heterogénea describiéndose series con una evolución similar de las lesiones cutáneas en aquellos en los que se suspende la medicación anti-TNF- $\alpha$  y en los que no. Mientras, otros trabajos reportan fracasos terapéuticos en aquellos pacientes en los que se mantiene el tratamiento inmunosupresor (33,34). De forma general, la recomendación de los expertos es la suspensión del tratamiento con anti TNF- $\alpha$  siempre que sea posible y hasta la resolución de las lesiones cutáneas o mucosas. Cuando esto no sea factible, se sugiere la posibilidad de cambiar el tratamiento y administrar aquellos fármacos en los que se ha visto que el riesgo parece ser menor como son el etanercept y certolizumab (30).

## DIAGNOSTICO

Para hacer un diagnóstico correcto de la LC y LM hay que tener en cuenta varios criterios. Por un lado, los criterios epidemiológicos, por otro lado, la presencia de clínica compatible y, finalmente, un diagnóstico parasitológico.

Desde un punto de vista clínico, debe sospecharse una LC ante la presencia de una o más lesiones cutáneas crónicas y antecedentes de exposición en un área endémica de leishmaniasis (35). El diagnóstico definitivo de basa en la detección

parasitológica. Esta puede ser o bien mediante la visualización de amastigotes en un estudio histológico o de promastigotes en el cultivo o mediante la detección de ADN de *Leishmania* por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El escenario ideal es poder combinar las tres técnicas y así maximizar el rendimiento diagnóstico. Si no se pueden realizar todas las pruebas, la histología y la PCR pueden proporcionar información suficiente. Por otro lado, siempre que sea posible, es importante determinar la especie de *Leishmania* implicada pues ayudará a determinar el tratamiento a seguir (36).

En la histórica clínica se debe incluir información relevante como la zona de residencia habitual, la convivencia con perros o gatos en el domicilio y la realización de viajes previos. Es especialmente importante recoger si el paciente presenta alguna clase de inmunosupresión, bien por otras comorbilidades o secundaria a tratamientos farmacológicos. En cuanto a los síntomas, es importante reflejar la duración de las lesiones, si son dolorosas y su evolución (si han mejorado o empeorado con el tiempo).

En la exploración física se debe palpar suavemente la lesión en busca de sensibilidad e induración y deben palparse también los ganglios linfáticos a los que drena regionalmente. Es importante explorar la piel próxima a la lesión y buscar posibles nódulos subcutáneos a lo largo de las cadenas linfáticas. Suele ser útil medir el diámetro de la lesión pues puede condicionar la opción terapéutica y es de ayuda en el seguimiento. Ante la presencia de síntomas ORL o ante el diagnóstico de una LC del Nuevo Mundo, será conveniente realizar un examen otorrinolaringológico endoscópico para descartar una afectación mucosa.

Si está disponible, el uso de un dermatoscopio puede ser de utilidad para distinguir LC de otras lesiones clínicamente similares. Dos estudios realizados en la costa del Mediterráneo, uno en España y el otro en Turquía, evaluaron mediante dermatoscopio lesiones de LC diagnosticadas histopatológicamente. En dicha evaluación, además del eritema y las estructuras vasculares observadas en prácticamente todas las lesiones, en ambos estudios se observaron estructuras blanco-amarillentas similares a lágrimas correspondientes a acúmulos de queratina en el 40% al 53% de las lesiones, y un patrón en estallido de estrellas blancas correspondientes a una hiperqueratosis en un 19% a un 39% de las lesiones (37,38).

Las muestras sobre las que realizar las pruebas diagnósticas debe obtenerse de aquellas lesiones que parezcan activas y ulcerosas y sin signos de infección secundaria (36). La distribución de los parásitos en la lesión es heterogénea. Por norma general se recomienda obtener la muestra de los bordes sobreelevados de la úlcera, especialmente de su margen externo. Las muestras se pueden obtener por medio de una biopsia, por raspado de la lesión o, cuando por la localización de la lesión no

conviene realizar biopsia, se pueden obtener muestras por medio de un aspirado en suero salino.

Las técnicas para la detección parasitológica varían en función de la muestra obtenida. Cuando se realiza un raspado se realiza un examen microscópico mediante la fijación y tinción de Giemsa de la muestra, lo que permite observar los amastigotes. Ante una muestra obtenida por biopsia es posible realizar diferentes técnicas. La mayor rentabilidad se obtiene realizando una PCR de *Leishmania* sp que además permita, mediante secuenciación, identificar de la especie de *Leishmania* implicada. Si se obtiene muestra suficiente, podría realizarse también cultivo de *Leishmania* identificando los promastigotes.

Sobre las muestras de las biopsias pueden realizarse otras técnicas como el cultivo de micobacterias, cultivo de aerobiosis (en el que es frecuente encontrar sobre infección de LC por *Staphylococcus aureus*) y cultivo de hongos que serán de ayuda en el diagnóstico diferencial de las lesiones. En algunas ocasiones, cuando la sospecha inicial no es de LC, la biopsia puede ser remitida exclusivamente a anatomía patológica donde el estudio histológico puede revelar también la presencia de parásitos de *Leishmania*. En estos casos es conveniente el envío de eluido o de las propias muestras parafinadas a microbiología para confirmar el diagnóstico.

La realización de una serología frente a *Leishmania* no está indicada en el diagnóstico de la LC. Su sensibilidad y especificidad son variables y los niveles de anticuerpos generalmente son bajos. La sensibilidad de la serología puede ser mayor en el contexto de LM (39).

La LC y LM pueden presentar manifestaciones clínicas diversas y ser similares a una amplia variedad de otros procesos cutáneos por lo que se requiere un arduo diagnóstico diferencial. Esto incluye descartar otras patologías infecciosas, tumorales u otros procesos como el pioderma gangrenoso (Tabla 1, 2) (40).

**Tabla 1. Diagnóstico diferencial de leishmaniasis cutánea.**

<b>Infecciones</b>	Ectima Impétigo Forunculosis Antrax Nocardiasis Esporotricosis Blastomycosis Paracoccidiomycosis Tuberculosis cutánea Micobacterias no tuberculosas ( <i>M. marinum</i> , <i>M. fortuitum</i> ) Lupus vulgar Úlcera de Buruli Goma sifilítico Pian Prototecosis Condiloma acuminado Lepra tuberculoide Miasis Tungiasis
<b>Neoplasias</b>	Carcinoma basocelular Carcinoma de células escamosas Carcinoma de células de Merkel Sarcoma de Kaposi Linfoma
<b>Otras</b>	Pioderma gangrenoso Queratoacantoma Picaduras de artrópodos Sarcoidosis

**Tabla 2. Diagnóstico diferencial de leishmaniasis mucosa.**

Rinoecleroma Sífilis Pian Carcinoma oral de células escamosas Sarcoidosis
---

## TRATAMIENTO

### Leishmaniasis cutánea

Actualmente no existe un único régimen terapéutico que sea eficaz para todas las distintas formas de LC de las diferentes áreas geográficas. El tratamiento debe

realizarse teniendo en cuenta las características de las lesiones (tamaño, número y localización), la patología de base del paciente, condiciones específicas como son el embarazo o la edad pediátrica, la toxicidad e interacciones de los fármacos y la especie de *Leishmania* implicada.

La OMS, en sus recomendaciones para el manejo de la LC adquirida en el Área Europea de la OMS clasifica la LC en tres estadios (leve, moderado y severo) en base a los cuales poder decidir el tratamiento más adecuado (4). Las recomendaciones para el tratamiento de la LC por *L. infantum* adquirida en España puede realizarse conforme a la guía de la OMS (4).

### Enfermedad leve

Se consideran como leves aquellos casos en los que el paciente presenta menos de 4 lesiones, de menos de 4 cm y en las que se dan las siguientes características:

- Infección por *L. infantum*.
- Datos de inicio de curación de la lesión.
- Lesiones no potencialmente desfigurantes (ej no localizadas en la cara).
- No presencia de condiciones inmunosupresoras o de otras co-morbilidades significativas.
- Posibilidad de seguimiento clínico estrecho.

Tratamiento indicado en los casos de enfermedad leve: Los pacientes pueden ser tratados sólo con cuidados locales de las lesiones con vendajes y limpieza local y el uso de pomada antiséptica para evitar la sobreinfección bacteriana.

### Enfermedad moderada

Se consideran como moderados aquellos casos con menos de 4 lesiones de menos de 4 cm y en las que se dan las siguientes condiciones:

- Infección por *L. infantum*.
- Lesión no en fase de resolución.
- Lesiones potencialmente desfigurantes (ej en la cara).
- No localizadas en o próximas a articulaciones de pequeño tamaño o periorificiales.

Tratamiento indicado en los casos de enfermedad moderada: Está recomendada la terapia local con las siguientes posibles pautas:

- a. Combinación de crioterapia y antimoniales intralesionales una vez a la semana de una a diez sesiones. Si no está disponible la crioterapia se podrían administrar los antimoniales solos.
- b. Pomada de paromomicina dos veces al día durante 20 días si está disponible.
- c. Termoterapia aplicando en una o más sesiones calor de hasta 50 °C durante 30 segundos, en función del tamaño de la lesión.

### Enfermedad severa

Se considera como enfermedad severa cuando se dan algunas de las siguientes condiciones:

- Las lesiones son de más de 4 cm.
- Cuando el paciente presenta más de 4 lesiones.
- Las lesiones son periorificiales o están próximas a pequeñas articulaciones.
- Presencia de diseminación linfática significativa.
- Presencia de condiciones inmunosupresoras.
- Fracaso previo de tratamiento local.
- No hay contraindicaciones para el tratamiento sistémico.

Tratamiento indicado en la enfermedad severa: En estos casos está indicado el tratamiento sistémico y siendo muy importante valorar la toxicidad e interacciones de a la hora de decidir el régimen terapéutico. Las distintas pautas recomendadas son:

- a. Antimoniales pentavalentes: 20 mg Sb<sup>5+</sup>/kg im o iv durante 10-20 días.
- b. Miltefosina: Oral 50 mg tres veces al día durante 28 días (es necesario la prescripción anticoncepción en las mujeres durante el tratamiento y durante al menos tres meses después).
- c. Anfotericina B liposomal 3 mg/Kg/día iv los días 1-5 y al día 10. Dosis total 18 mg/kg.

Para determinados grupos especiales las recomendaciones terapéuticas son algo más restringidas. En el caso de los niños, el tratamiento local con antimoniales intralesionales y la crioterapia pueden pautarse sin contraindicaciones, de hecho, suele ser el tratamiento local más habitual. La termoterapia, por el contrario, no debe administrarse en menores de 5 años. En cuanto al tratamiento sistémico, no hay restricciones para el uso de anfotericina B liposomal ni para los antimoniales. Sin embargo, la miltefosina no debe administrarse en menores de 18 meses. En las embarazadas, como terapia local es posible emplear la crioterapia, pero no así los

antimoniales intra lesionales. Si es necesario tratamiento sistémico, solamente debería emplearse la anfotericina B liposomal. Durante la lactancia materna, la crioterapia es la mejor alternativa de tratamiento local, aunque los antimoniales pentavalente intra lesionales o sistémicos parecen ser también seguros dada su baja excreción en la leche materna (4).

### Leishmaniasis mucosa

No hay ensayos clínicos que puedan dar evidencia al manejo terapéutico de la LM por *L. infatum*. De este modo las recomendaciones se basan en los tratamientos habitualmente pautados en la leishmaniasis mucosa del Nuevo Mundo. En todos los casos el tratamiento de elección es sistémico y las opciones terapéuticas son: (19,41,42).

- a. Anfotericina B liposomal: A dosis de 21 a 40 mg/Kg dosis total iv.
- b. Miltefosina: Oral 50 mg tres veces al día durante 28 días.
- c. Antimoniales pentavalentes: 20 mg Sb5+/kg im o iv durante 20 días.

### SEGUIMIENTO

Son varias las guías y comités de expertos que recomiendan realizar un seguimiento durante 12 de aquellos pacientes con LC/LM que han sido tratados mediante una reevaluación al mes, a los tres meses, a los seis meses y a los doce meses tras finalizar el tratamiento (36,41,42).

Se ha definido como curación la evidencia de aplanamiento de las lesiones y re-epitelización completa de las úlceras a los tres meses de inicio de tratamiento. Por su parte se considera fracaso terapéutico cuando no hay evidencia de mejoría clínica (no evidencia de cambios o empeoramiento de la lesión) al mes de inicio del tratamiento o la no evidencia de curación a los tres meses de inicio de tratamiento. El término recidiva, por su parte, hace referencia a la reaparición de ulceración después de una curación completa previa o un incremento en la induración en el área de una lesión nodular previa (42,43).

Es importante mencionar que durante las primeras 2 a 3 semanas desde el comienzo del tratamiento se puede producir un incremento paradójico de la lesión como consecuencia de la reacción inflamatoria local que puede ser difícil de diferencia de un fracaso terapéutico. (36). Hay que tener presente que la re-epitelización y la curación pueden persistir tras haber acabado el tratamiento, especialmente cuando las lesiones son de gran tamaño. Por su parte, el primer signo de curación consiste

en el aplanamiento de la lesión y entre la semana 4 y 6 después del tratamiento, el tamaño de la lesión debería haber disminuido > 50% su tamaño.

Ante una sospecha de recidiva, no es necesaria la confirmación parasitológica, excepto en ciertos casos complejos, en los que la identificación del parásito puede ser necesaria. Esta debe hacerse mediante microscopia o cultivo en vez de por PCR debido a que esta puede perdurar positiva incluso años después de la curación (44).

## REFERENCIAS

1. World Health Organization. Leishmaniasis. Fact Sheets. 2020. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. Berriatua E, Maia C, Conceição C, Özbel Y, Töz S, Baneth G, *et al.* Leishmaniasis in the European Union and Neighboring Countries. *Emerg Infect Dis.* junio de 2021;27(6):1723-7.
3. WHO. José Antonio Ruiz-Postigo,a Saurabh Jain,a Alexei Mikhailov,a Ana Nilce Maia-Elkhoury,b Samantha Valadas,b Supriya Warusavithana,c Mona Osman,c Zaw Lin,d Abate Beshah,e Aya Yajima,f Elkhan Gasimovg. Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Weekly Epidemiological Record*, No 35, 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>
4. Gradoni L, López-Vélez R, Mokni M. Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region WHO/Regional office for Europe. 5 July 2017. ISBN: 978 92 89052 51 <https://www.who.int/publications/i/item/9789289052511>
5. Situación de leishmaniasis en España. Años 2019, 2020 y 2021 Beatriz Fernández-Martínez<sup>1,2</sup> Departamento de Enfermedades Transmisibles, Centro Nacional de Epidemiología (CNE), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid 28029, España. 2CIBER de Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III (CIBERESP, ISCIII), Madrid 28029, España. orcid 0000-0001-8831-3164. Disponible: <https://revista.isciii.es/index.php/bes>
6. Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* febrero de 2007;46(2):132-42.
7. Urrutia, S.; García, C.; Schoendorff, C.; Sáez, A.; Olivares, M.; García-Almagro, D. Leishmaniasis cutánea en la provincia de Toledo. Estudio de 43 pacientes. *Actas Dermosifiliogr.* 2000, 91, 1-8. 29.

8. Aguado M, Espinosa P, Romero-Maté A, Tardío JC, Córdoba S, Borbujo J. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Fuenlabrada, Madrid. *Actas Dermosifiliogr.* mayo de 2013;104(4):334-42.
9. Alcalde Alonso, M.; Delgado Florencio, V.; Naranjo Sintés, R. Leishmaniasis cutáneas en Granada: Características clínicas. *Actas Dermosifiliogr.* 1989, 80, 267-272.
10. Daudén, E.; García, C.; Zarco, C.; López, S.; Iglesias, L. Leishmaniasis cutánea en el foco endémico de Madrid. Estudio de 31 casos. *Actas Dermosifiliogr.* 1990, 81, 395-404.
11. Alcover MM, Rocamora V, Ribas A, Fisa R, Riera C. Underestimation of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* in an Endemic Area of the Mediterranean Basin (Balearic Islands). *Microorganisms.* 4 de enero de 2023;11(1):126.
12. García-Almagro D. [Cutaneous leishmaniasis]. *Actas Dermosifiliogr.* 2005;96(1):1-24.
13. Albero Blanes F, Martínez Sánchez C, Román Macia P. [Cutaneous leishmaniasis. Alcoy: an endemic zone]. *Actas Dermosifiliogr.* 1979;70(7-8):475-84.
14. Monge-Maillo B, Norman FF, Chamorro-Tojeiro S, Gioia F, Pérez-Molina JA, Chicharro C, *et al.* Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in an HIV-negative patient treated with miltefosine. *J Travel Med.* 4 de noviembre de 2022;29(7):taab169.
15. Guerra JA de O, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI de ARC, Gama P, Moura A, *et al.* Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 8 de marzo de 2011;5(3):e980.
16. Bañuls J, Boix V, Portilla J, Silvestre JF. Leishmaniasis as a cause of oral disease in HIV infection. *AIDS Lond Engl.* enero de 1995;9(1):96-8.
17. Morsy TA, Khalil NM, Salama MM, Hamdi KN, al Shamrany YA, Abdalla KF. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Saudi Arabia. *J Egypt Soc Parasitol.* abril de 1995;25(1):73-9.
18. Ghalib HW, Eltoum EA, Kroon CC, el Hassan AM. Identification of *Leishmania* from mucosal leishmaniasis by recombinant DNA probes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86(2):158-60.
19. Aliaga L, Cobo F, Mediavilla JD, Bravo J, Osuna A, Amador JM, *et al.* Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*:

- clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine (Baltimore)*. mayo de 2003;82(3):147-58.
20. Garrido-Jareño M, Sahuquillo-Torralba A, Chouman-Arcas R, Castro-Hernández I, Molina-Moreno JM, Llavador-Ros M, *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: experience of a Mediterranean hospital. *Parasit Vectors*. 13 de enero de 2020;13(1):24.
  21. García de Marcos JA, Dean Ferrer A, Alamillos Granados F, Ruiz Masera JJ, Cortés Rodríguez B, Vidal Jiménez A, *et al.* Localized Leishmaniasis of the oral mucosa. A report of three cases. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal*. 1 de agosto de 2007;12(4):E281-286.
  22. Freites-Martínez A, Córdoba S, Bermejo A, Borbujo J. Mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* var *Lombardi* in an immunocompetent patient, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(7):499-500.
  23. J van Griensven, E Carrillo, R López-Vélez, L Lynen, J Moreno. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):286-99.
  24. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis*. agosto de 2014;8(8):e3021.
  25. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. abril de 2008;21(2):334-59, table of contents.
  26. Lartey M, Adusei L, Hanson-Nortey L, Addy J. Coinfection of Cutaneous Leishmaniasis and HIV Infection. *Ghana Med J*. septiembre de 2006;40(3):110-2.
  27. Paredes R, Muñoz J, Díaz I, Domingo P, Gurgui M, Clotet B. Leishmaniasis in HIV infection. *J Postgrad Med*. 2003;49(1):39-49.
  28. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient - PubMed [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16517925/>
  29. Ramos A, Cruz I, Muñoz E, Salas C, Fernández A, Alvarez-Espejo T. Post-kala-azar dermal Leishmaniasis and uveitis in an HIV-positive patient. *Infection*. marzo de 2008;36(2):184-6.
  30. Arens K, Filippis C, Kleinfelder H, Goetzee A, Reichmann G, Crauwels P, *et al.* Anti-Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Therapeutics Differentially Affect *Leishmania* Infection of Human Macrophages. *Front Immunol*. 2018;9:1772.

31. Palacios-Díaz RD, Sahuquillo-Torrallba A, Rocamora-Durán V, Unamuno-Bustos B de, Salavert-Lleti M, Santos-Alarcón S, *et al.* Clinicopathological characteristics of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in patients treated with TNF- $\alpha$  inhibitors. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. mayo de 2023;21(5):473-80.
32. Martínez-Doménech A, García-Legaz-Martínez M, Magdaleno-Tapial J, Torrecillas M, Hernández-Bel P, Ocete Mochón MD, *et al.* Anti-tumour necrosis factor-associated cutaneous leishmaniasis: a single-institution experience. *Br J Dermatol*. agosto de 2019;181(2):403-5.
33. Marcoval J, Penín RM, Sabé N, Valentí-Medina F, Bonfill-Ortí M, Martínez-Molina L. Cutaneous leishmaniasis associated with anti-tumour necrosis factor- $\alpha$  drugs: an emerging disease. *Clin Exp Dermatol*. abril de 2017;42(3):331-4.
34. Neumayr ALC, Morizot G, Visser LG, Lockwood DNJ, Beck BR, Schneider S, *et al.* Clinical aspects and management of cutaneous leishmaniasis in rheumatoid patients treated with TNF- $\alpha$  antagonists. *Travel Med Infect Dis*. 2013;11(6):412-20.
35. Aronson NE, Joya CA. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. *Infect Dis Clin North Am*. marzo de 2019;33(1):101-17.
36. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de diciembre de 2016;63(12):e202-64.
37. Llambrich A, Zaballos P, Terrasa F, Torne I, Puig S, Malvehy J. Dermoscopy of cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol*. abril de 2009;160(4):756-61.
38. Yücel A, Günaşti S, Denli Y, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: new dermoscopic findings. *Int J Dermatol*. julio de 2013;52(7):831-7.
39. Romero GAS, de la Glória Orge Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macêdo V, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* or *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* in Brazil. *Acta Trop*. enero de 2005;93(1):49-56.
40. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *J Am Acad Dermatol*. diciembre de 2015;73(6):911-26; 927-8.

41. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*. noviembre de 2013;73(17):1889-920.
42. Blum J, Buffet P, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, *et al.* LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014. *J Travel Med*. 2014;21(2):116-29.
43. WHO Technical Report Series. Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-949>
44. Mendonça MG, de Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis*. 15 de marzo de 2004;189(6):1018-23.

## CAPÍTULO 4

# Diagnóstico de laboratorio de la leishmaniasis

Carmen Chicharro<sup>1,2</sup>, Emilia García<sup>1</sup>, Ana Peña<sup>1</sup>, Sheila Ortega<sup>1</sup>, Silvia Miguelañez<sup>1</sup>, María Flores<sup>1,3</sup>, Javier Nieto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas.

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.

Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

<sup>3</sup> Fundación Mundo Sano.

## INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de métodos de diagnóstico efectivos es crucial para la identificación de una enfermedad, elección del tratamiento adecuado, la determinación de las resistencias a fármacos y la implementación de medidas de salud pública para su prevención y control.

En el caso de las leishmaniasis, especialmente en la leishmaniasis visceral (LV) es fundamental el diagnóstico precoz, ya que esta enfermedad puede ser mortal si no es diagnosticada a tiempo y es tratada de manera adecuada.

El diagnóstico clínico de la leishmaniasis, por sí solo, carece de especificidad y se considera insuficiente siendo necesario realizar el diagnóstico diferencial con diversas patologías (1). En el caso de la leishmaniasis cutánea (LC), las lesiones que aparecen pueden ser diferentes y evolucionar de distinta manera dependiendo de la especie de *Leishmania* responsable de la infección. En estos casos, y dependiendo del área geográfica, es necesario descartar enfermedades como el cáncer de piel, la blastomycosis, el impétigo, el pian, la lepra, lupus, picaduras infectadas, y esporotricosis, entre otras afecciones cutáneas.

En el caso de la LV, la fiebre, la hepatoesplenomegalia y la pancitopenia forman la tríada sintomática característica, pero es necesario descartar otras patologías como malaria, mononucleosis infecciosas, leucemias, linfoma, y esquistosomiasis.

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

De manera general, un caso de leishmaniasis se confirma cuando se demuestra la presencia del parásito, es importante acompañarlo con una buena historia clínica y suficientes datos epidemiológicos.

Idealmente, una prueba de diagnóstico debería reunir las siguientes características:

1. económicamente asequible;
2. altamente sensible (es decir, presentar pocos resultados falso-negativos) ya que, en el caso de la LV, el desenlace puede ser fatal;
3. altamente específico (pocos resultados falso-positivos) debido a que los fármacos utilizados para el tratamiento son tóxicos y muy caros;
4. simple y requerir un entrenamiento mínimo;
5. rápido (para permitir el tratamiento en la primera visita) y robusto (que no requiera refrigeración);
6. no deben necesitar equipos para su realización

Desafortunadamente, para el diagnóstico de la leishmaniasis no hay ninguna herramienta que reúna todas estas características. En este sentido, en este capítulo describimos una revisión sobre la evolución del diagnóstico de laboratorio de la leishmaniasis y su aplicación en el «Estudio integral del brote comunitario de leishmaniasis en la Comunidad de Madrid».

### Inmunodiagnóstico

Las técnicas inmunológicas empleadas en el diagnóstico de la leishmaniasis permiten valorar tanto la respuesta inmunitaria celular como la humoral (producción de anticuerpos).

#### Técnicas de Inmunidad celular

La respuesta inmunitaria celular específica frente a *Leishmania* es un indicador crucial de una respuesta protectora Th1. Las principales pruebas de estudio de la inmunidad celular se pueden dividir en métodos *in vivo* (el test de Montenegro o prueba de la leishmanina) y métodos *ex vivo* (estudio de linfoproliferación *in vitro*).

### El test de Montenegro o leishmanina

Valora la respuesta de hipersensibilidad retardada. Este ensayo se basa en la inoculación intradérmica de una solución salina-fenolada de promastigotes (leishmanina) y la posterior evaluación de la reacción dérmica desencadenada (la formación de un nódulo o induración de diámetro mayor o igual a 5 mm se considera un resultado positivo). En general, el resultado de esta prueba es positivo en casos de LC activas y en personas que han estado en contacto con el parásito y han superado la infección, pero es negativo durante un episodio activo de LV (2,3).

A pesar de su utilidad, actualmente esta técnica está en desuso debido a que la leishmanina no se produce de forma regulada en ningún laboratorio.

### Estudio de linfoproliferación

Esta técnica permite evaluar la respuesta celular *in vitro*. Consiste en el cultivo de linfocitos de sangre periférica, en presencia de antígenos específicos del parásito para valorar la respuesta linfoproliferativa. Los individuos resistentes y sin signos clínicos presentan una respuesta proliferativa fuerte frente a los antígenos de *Leishmania*, mientras que los individuos susceptibles presentan un resultado negativo. De momento esta técnica está poco estandarizada y sólo es aplicable en algunos laboratorios de referencia.

### Técnicas serológicas

Las técnicas serológicas son de escaso valor en el diagnóstico de la LV en pacientes inmunodeprimidos (4), LMC y LC, ya que en estos casos no se produce una elevación en el título de anticuerpos (5), sin embargo, son muy útiles en el diagnóstico de la LV en individuos inmunocompetentes.

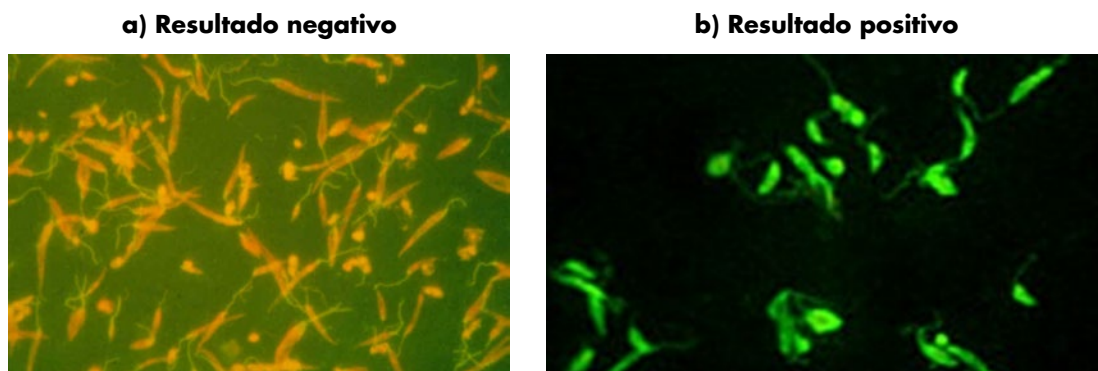
A pesar de su utilidad, presentan algunas limitaciones:

- los títulos de anticuerpos permanecen detectables durante varios años después de la curación, por lo no permiten el diagnóstico de las recaídas;
- detectan infecciones asintomáticas;
- existen reacciones cruzadas frente a otros patógenos como *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Toxoplasma* y *Babesia*;
- en casos de inmunodepresión, la sensibilidad es baja.

Las principales técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de la leishmaniasis son la Inmunofluorescencia indirecta (IFI), el Enzimoimmunoensayo (ELISA) y sus diferentes variantes (ELISA competitivo, Dot-ELISA, FAST-ELISA) y el Test

de aglutinación directa (DAT). La IFI está considerada como la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de la LV debido a que presenta una alta sensibilidad (80-100%) y especificidad (90-100%) (6).

**Figura 1. IFI.**



En el caso de emplear una técnica de ELISA, la sensibilidad y especificidad dependerán del tipo de antígeno seleccionado para enfrentarlo al suero problema (extractos totales o solubles del parásito, proteínas purificadas o proteína recombinantes).

En los últimos años, se han desarrollado también diversas pruebas rápidas inmunocromatográficas (ICT) o *dipsticks* que nos informan sobre la presencia/ausencia de anticuerpos (son técnicas cualitativas). El antígeno recombinante rK39 es uno de los más empleados en este tipo de diagnóstico, ya que tiene una alta especificidad, aunque su sensibilidad varía dependiendo de la zona donde se realice el estudio (7). Estos kits son rápidos y fáciles de usar, lo que permite una actuación inmediata del sanitario, siendo muy útiles en estudios de campo.

### Técnicas de detección de antígeno

Existen varias pruebas comerciales que permiten la detección de antígenos de *Leishmania*. Una de estas pruebas se trata de un test de aglutinación basado en partículas de látex (KAtex) para la detección de antígeno de *Leishmania* en orina en casos de LV, que si bien presentó una gran especificidad también mostró una sensibilidad muy variable, por lo que ha caído en desuso (8).

En el caso de la LC, se ha desarrollado una prueba rápida basada en la detección de la peroxidoxina del amastigote, si bien su precisión diagnóstica varía en los diferentes estudios realizados (9).

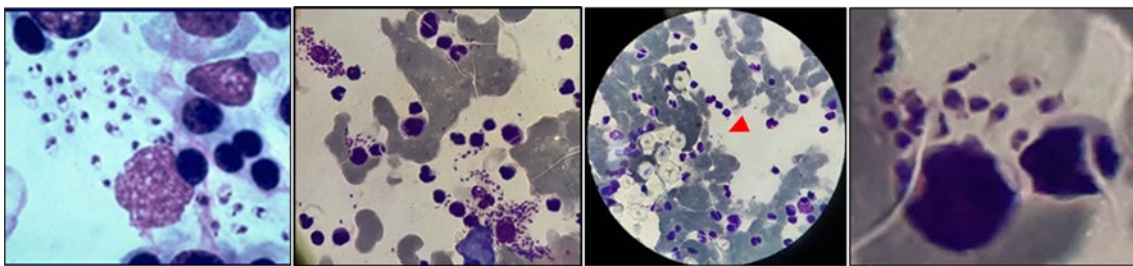
## Diagnóstico parasitológico

Como hemos indicado anteriormente, la presencia del parásito *Leishmania* en la muestra clínica de un paciente con sospecha clínica, confirma la infección. Para ello se cuenta con:

### Observación microscópica

Consiste en la observación directa de amastigotes de *Leishmania* en extensiones de la muestra clínica, principalmente nódulo linfático, médula ósea, sangre, aspirados o biopsias cutáneas, teñidas mediante métodos metacromáticos convencionales (Giemsa, May-Grunwald, Diff-Quick ([Figura 2](#))). Su especificidad es elevada pero su sensibilidad depende de la muestra clínica, la calidad del frotis, el número de campos visuales examinados, la carga parasitaria y la experiencia del observador.

**Figura 2. Extensión de médula ósea teñida con Giemsa.**



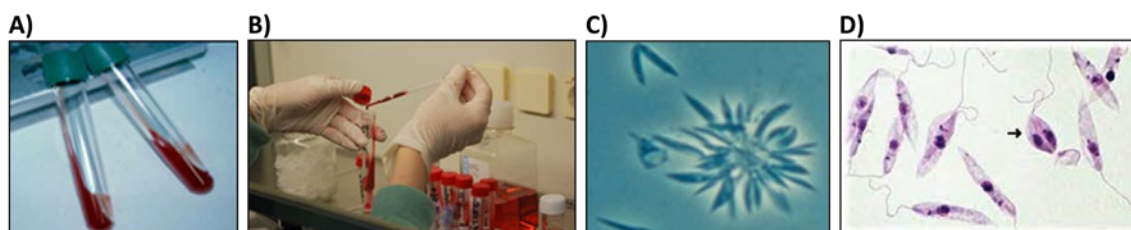
En condiciones óptimas y contando con personal cualificado, en el caso de la LC la sensibilidad es del 80%, disminuyendo mucho tanto en los casos con más de 6 meses de evolución, como en los casos de leishmaniasis mucocutánea (LMC). En el diagnóstico de LV, la sensibilidad puede llegar al 90% ([1](#)) si se analizan aspirados esplénicos o de médula ósea, pero esta sensibilidad es menor cuando se trata de muestras menos invasivas como la sangre periférica.

### Cultivo en medio específico

Aunque existen medios de cultivo comercialmente disponibles como el Schneider's *Drosophila* o RPMI, no son muy efectivos para el aislamiento del parásito. El medio de cultivo más idóneo es el NNN (de agar-sangre de conejo y antibióticos). La muestra clínica (sangre, aspirado o biopsia del órgano homogeneizada) se inocula en este medio de cultivo y se mantiene a una temperatura de 27°C. En estas condiciones los amastigotes se transforman en promastigotes que pueden visualizarse

al microscopio a partir de la primera semana de cultivo, aunque pueden requerirse resiembras semanales. Si después de 4 semanas consecutivas no se observan promastigotes al microscopio, el cultivo se considera negativo ([Figura 3](#)).

**Figura 3. A) Tubos de NNN para aislamiento de *Leishmania*. B) Inoculando una muestra en una campana de flujo laminar. C) Promastigotes en roseta de *Leishmania* en cultivo. D) Promastigotes teñidos con Giemsa.**



El cultivo es más sensible que la observación microscópica directa y a pesar de que posee una especificidad del 100%, no se emplea de manera rutinaria debido a que es muy laborioso, requiere mayor tiempo para obtener resultados (hasta cuatro semanas si el resultado es negativo) y presenta riesgo de contaminación (ver [Tabla 1](#)). Principalmente se utiliza en investigación y estudios epidemiológicos que requieren el aislamiento del parásito para su posterior caracterización por otras técnicas.

### Xenodiagnóstico

Esta técnica se basa en detectar y aislar el parásito a partir de flebótomos alimentados sobre el hospedador objeto de diagnóstico. Se utiliza fundamentalmente de forma experimental. El paciente se expone a la picadura de hembras de flebótomo durante una hora, con el fin de demostrar la presencia de promastigotes en el tubo digestivo de los flebótomos pasados 4-5 días. A pesar de la especificidad y sensibilidad indiscutible de este método, únicamente es aplicable en laboratorios altamente especializados que dispongan de un insectario con colonias de flebótomos bien establecidas. Ver capítulo específico.

### Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular consiste en aplicar técnicas de biología molecular para detectar la presencia del material genético del agente infeccioso, ya sea ADN o ARN.

En el caso de las leishmaniasis, el primer paso para llevar a cabo el diagnóstico molecular es la extracción del ADN a partir de la muestra clínica. Este paso es crítico y se debe evitar cualquier tipo de contaminación que pueda alterar el resultado final,

por lo que deben usarse controles para asegurar la validez del ensayo. Actualmente, la principal técnica de diagnóstico molecular es la PCR en cualquiera de sus variantes.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR consiste en la amplificación *in vitro* de una región específica del ADN de *Leishmania*.

Usando los *primers* adecuados se puede llegar a una especificidad del 100%, y como una molécula de ADN puede dar lugar a  $10^9$  nuevas moléculas, su sensibilidad es muy alta. Como ventajas añadidas a su alta sensibilidad y especificidad está su rapidez (6 horas vs 4 semanas que requiere el cultivo) y que puede aplicarse tanto a cualquier tipo de muestras clínicas (fluidos, biopsias, aspirados, etc.) como a muestras de vectores o reservorios, siendo por tanto también muy útil en trabajos de epidemiología.

Existen diferentes secuencias diana utilizadas en el diagnóstico de la leishmaniasis (10), entre las más frecuentes se encuentra el espaciador transcrito interno-1 (ITS1), los minicírculos del kinetoplasto (kDNA), o el ADN que codifica el miniexón. Sin embargo, la región más utilizada es el gen que codifica la subunidad pequeña ribosomal (SSUrRNA) presente en todas las especies de *Leishmania* en un número entre 100-200 copias, lo que asegura una buena sensibilidad.

Entre las variantes de la PCR más empleadas en el diagnóstico de la leishmaniasis están la PCR anidada o *nested* PCR (LnPCR) y la PCR en tiempo real (qPCR).

### *Nested* PCR o PCR anidada

Esta metodología consiste en dos reacciones de PCR sucesivas, estando la segunda reacción destinada a amplificar el producto obtenido en la primera, incrementando la sensibilidad y la especificidad de la técnica. Uno de los protocolos más usados es la *nested*-PCR que amplifica la región SSUrRNA (LnPCR). Esta PCR es capaz de detectar 0.01 parásitos, con una especificidad del 100% (11,12).

Con la LnPCR, se mejoró la sensibilidad en el diagnóstico de LC y LMC, aproximándose al 100%. En el caso de la LV, la sensibilidad usando sangre periférica se situó entre el 70 y 100% (11,12,13), por lo que esta técnica ha podido aplicarse con mucho éxito en muestras de sangre (muestra poco invasiva) y sólo en los casos en los que la carga parasitaria es muy baja es necesario recurrir al estudio de una muestra de médula ósea para confirmar la infección.

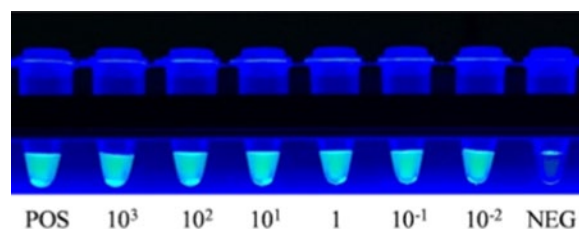
### PCR a tiempo real (qPCR)

Se caracteriza porque los procesos de amplificación y detección del producto amplificado se producen de manera simultánea, ahorrando tiempo. Esto se consigue añadiendo a la mezcla de reacción una molécula que producirá fluorescencia a medida que se amplifique el producto esperado. Este agente fluorescente puede ser inespecífico (un agente intercalante) o específico (sondas de secuencias específicas marcadas con fluorocromos). En condiciones de eficiencia adecuada, la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN inicial presente en la muestra, por lo que se puede cuantificar la carga parasitaria, información muy útil en los controles postratamiento. Recientemente se han publicado estudios que demuestran que la qPCR puede tener la misma sensibilidad que la LnPCR a pesar de contar con sólo una reacción de PCR (14). Estos resultados junto a que no hay necesidad de llevar a cabo una electroforesis para ver los productos amplificados, hace que esta técnica esté desplazando paulatinamente a las técnicas convencionales de PCR.

### Amplificación isotérmica

Con el fin de reducir las necesidades de infraestructura, en los últimos años también se han desarrollado métodos de amplificación a temperatura constante. Estas técnicas son el LAMP (*Loop Mediated Amplification*), que amplifica el ADN del parásito, el NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), que amplifica el ARN y el RPA (*Recombinase Polymerase Amplification*) que amplifica tanto ADN como ARN. Hasta la fecha, LAMP es la técnica más empleada. El prototipo Loopamp™ *Leishmania* Detection Kit (Eiken Chemical Co.) es el kit más empleado, usándose en estudios con muestras clínicas de Colombia, Etiopía y España. Los resultados obtenidos se correlacionan adecuadamente con los mediante LnPCR o qPCR (15), detectándose hasta 0.01 parásito (Figura 4).

**Figura 4. Límite de detección de LAMP para el diagnóstico de *Leishmania*.**



## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA LEISHMANIASIS EN ESPAÑA

La Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas (CNM-ISCIH) como Centro Colaborador de la OMS en Leishmaniasis, ofrece apoyo a los diferentes hospitales para confirmar la sospecha clínica de leishmaniasis. Las pruebas de diagnóstico empleadas en la rutina del laboratorio se basan en una PCR anidada que amplifica la región SSUrRNA (Ln-PCR), cultivos y pruebas serológicas (16). En la [Tabla 1](#), se resumen las características de estas técnicas.

Según diferentes estudios realizados la LnPCR, fue la técnica que presentó mayor sensibilidad y especificidad por este motivo es la herramienta que se usa de manera habitual para llevar a cabo el diagnóstico en muestras clínicas de pacientes con sospecha de leishmaniasis, tanto cutánea como visceral. El cultivo en medio NNN, se lleva a cabo no sólo con fines diagnósticos (su sensibilidad es mucho menor que la de la LnPCR), sino también con la finalidad de aislar las cepas del parásito, criopreservarlas y tenerlas a disposición para estudios futuros de identificación de resistencias, caracterización molecular, genética de poblaciones, etc.

El diagnóstico serológico se lleva a cabo mediante IFI y el test inmunocromatográfico (rK39 ICT), si bien los resultados obtenidos con estas técnicas no se han recogido en el presente capítulo.

**Tabla 1. Principales técnicas utilizadas para el diagnóstico de la leishmaniasis humana en España.**

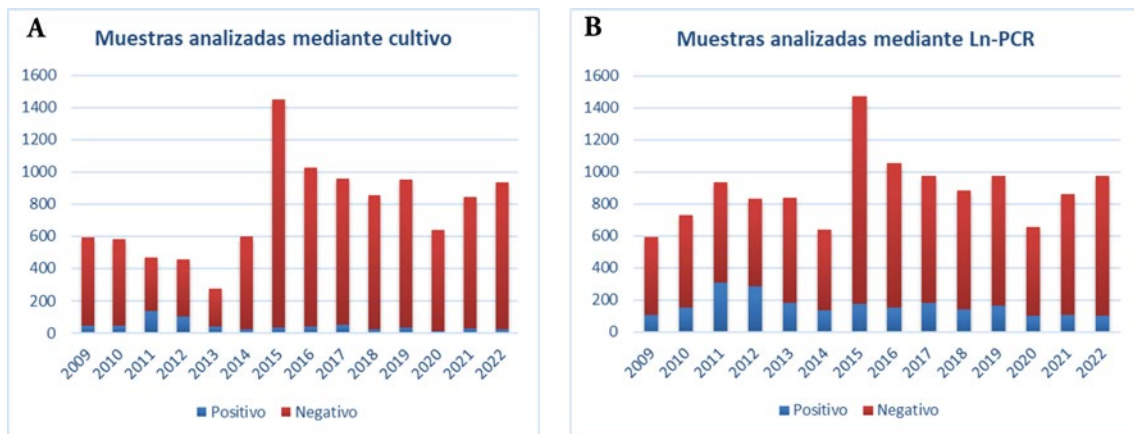
Test	Tiempo de ejecución	Muestra	Sensibilidad	Ref.
Observación microscópica	1 hora	Médula ósea	67-73%	8,17,18
		Biopsias	36-65%	19,20
Cultivo	hasta 4 semanas	Médula ósea	36-66%	13,17,18
		Sangre periférica	61-92%	13
PCR	6 horas	Médula ósea	100%	8,11
		Sangre periférica	79-100%	8,11,13
		Biopsias	92.5%	20
IFI	4 horas	Suero/Plasma	63-84%	7,6
rK39ICT	20 minutos	Suero/Plasma	67-83%	7

Desde el año 2009, año en el que se declara el inicio del brote de leishmaniasis de la CM, hasta el año 2022, en nuestro laboratorio se han examinado más de 23 000 muestras con sospecha clínica de leishmaniasis. 10 661 muestras fueron anali-

zadas mediante cultivo y 12 423 mediante LnPCR. De todas ellas fueron positivas 630 (6%) por cultivo y 2305 (19%) por LnPCR. Estos datos están reflejados por años en la figura 5.

Algunas de las muestras clínicas recibidas fueron biopsias parafinadas o no llegaban con volumen suficiente para poder realizar las dos metodologías, por este motivo, el número de muestras que pudieron cultivarse fue menor al de las que pudieron ser analizadas mediante diagnóstico molecular.

**Figura 5. evolución del número de muestras clínicas analizadas mediante cultivo (A) y LnPCR (B)**



Aunque la figura 5 refleja los datos de todas las muestras analizadas en el laboratorio, que proceden de hospitales de todas las Comunidades Autónomas, en los años siguientes a la declaración de inicio del brote de la Comunidad de Madrid, se observa un incremento significativo de los diagnósticos positivos tanto llevado a cabo mediante cultivo como por PCR (ver año 2010-2012).

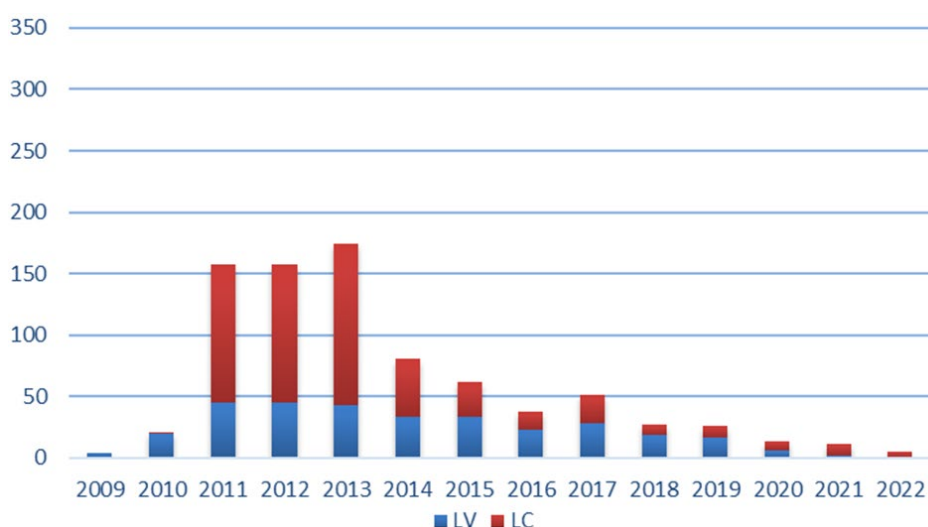
## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO EN EL ABORDAJE DEL BROTE COMUNITARIO DE LA LEISHMANIASIS EN LA COMUNIDAD DE MADRID

Teniendo en cuenta que la sensibilidad del cultivo es tres veces menor que la LnPCR, el diagnóstico de la leishmaniasis de los pacientes procedentes del área del brote, se realizó principalmente mediante LnPCR, y todos los datos que se describen a continuación reflejan esta información.

Como muestra la [Figura 6](#), en el año 2010 se observó un incremento de 5 veces en el número de muestras positivas, siendo este incremento de hasta 40 veces en el año 2011, ambos datos con respecto al 2009.

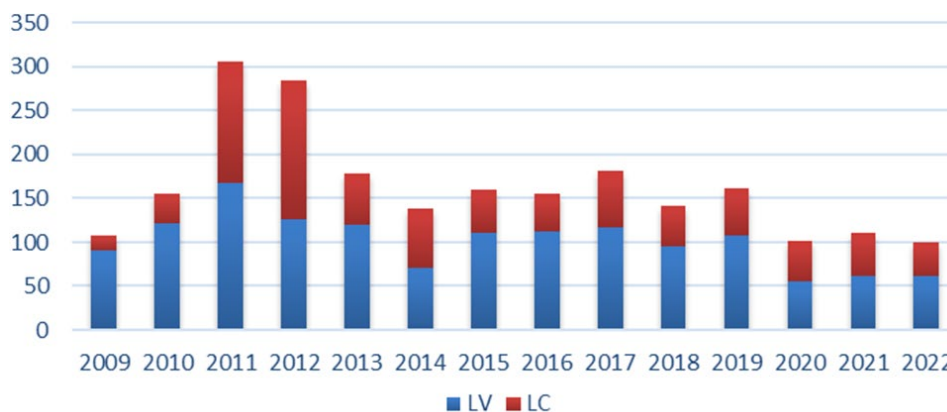
Durante los años 2011-2013, el número de muestras positivas se mantiene muy elevado ( $n > 150$ ) y comienza a disminuir en 2014 como consecuencia de las medidas de prevención y control llevadas a cabo por las autoridades sanitarias de la Comunidad de Madrid. Actualmente, el número de muestras positivas detectadas en esta área es similar al que se observaba en los años previos a la declaración del brote.

**Figura 6. frecuencia de las muestras de casos de LV y LC detectados en el área del brote mediante LnPCR.**



La detección de LC es especialmente elevada en el área del brote, este dato es especialmente destacable entre los años 2011 y 2013, donde los casos de LC duplicaron los de LV ([Figura 6](#)), a diferencia de lo que se observa en el resto del país, en el que los casos de LV son siempre superiores a los de LC (ver años 2009, [Figura 7](#)).

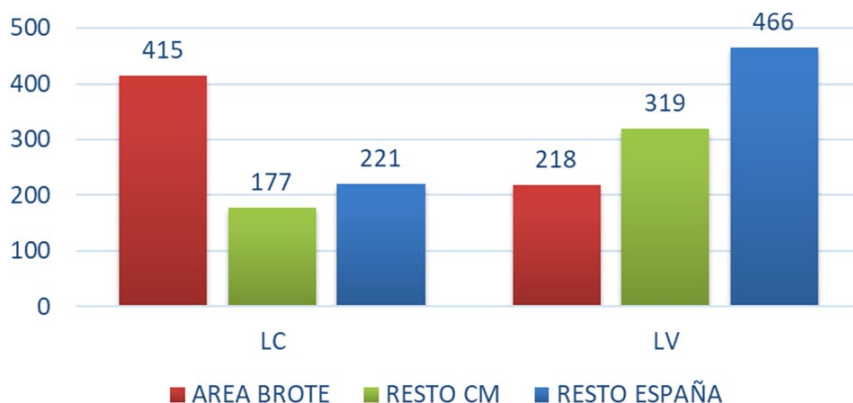
**Figura 7. frecuencia de los casos de LV y LC analizados en el CNM procedentes de todas las comunidades autónomas.**



En los años 2011 y 2012, el 75% de los casos de LC diagnosticados en nuestro laboratorio se correspondían con muestras procedentes de pacientes que residían en el área del brote ([Figura 6](#) vs [Figura 7](#)), y por ello, en estos años la proporción LV/LC a nivel nacional es muy próximo a 1. Estos datos indican que el brote supuso un cambio en el perfil epidemiológico de la leishmaniasis en España durante estos años.

En la figura 8 se resumen el número total de casos de leishmaniasis detectados entre 2009 y 2022 en el CNM según la forma clínica y la procedencia geográfica. Los casos procedentes del área del brote representan un tercio del total de casos confirmados en este periodo de tiempo (633 vs 1816).

**Figura 8. Casos confirmados de leishmaniasis entre 2009 y 2022 en el CNM, por forma clínica y origen geográfico.**



Nuevamente, es importante destacar que el número de casos de LC en el área del brote duplica al de casos de LV, contrariamente a lo que sucede en el resto de España, donde esta relación es invertida (LV > LC).

## CONCLUSIONES

El diagnóstico molecular ha supuesto un avance importante en el diagnóstico de la leishmaniasis. Este recurso permite la detección temprana de *Leishmania* en muestra menos invasiva (sangre periférica) y requiere menos tiempo que el cultivo (24 horas). Conociendo la mayor sensibilidad de la LnPCR respecto al cultivo, antes de que la técnica molecular se introdujera en el diagnóstico de rutina en el laboratorio, dos tercios de los pacientes infectados con el parásito no eran diagnosticados adecuadamente, factor que contribuía a la subdeclaración de casos.

Tras la declaración del brote, nuestros resultados indican que el número global de casos diagnosticados de LC se ha duplicado como consecuencia de una mayor sensibilización de los profesionales clínicos, que están más atentos a la aparición de lesiones cutáneas, lo que conlleva a que el número de biopsias de piel analizadas en el CNM se haya triplicado desde 2009.

La disminución del número de casos de leishmaniasis confirmados en el CNM, apoya la idea de que el brote ha sido controlado.

La información que se obtiene en el laboratorio es crucial para realizar la vigilancia de la leishmaniasis. El programa de vigilancia de la Comunidad de Madrid ha facilitado la detección y control del brote, de manera que actualmente el número de los casos declarados son semejantes a los observados en los años previos al brote. Teniendo en cuenta estos resultados, la estrategia de trabajo de los diferentes profesionales involucrados en el control de este brote urbano debería extrapolarse a otras regiones de España donde la incidencia de la leishmaniasis es endémica.

## REFERENCIAS

1. Llanes-Acevedo IP *et al.* 2015. Leishmaniasis. En «Diagnóstico de las enfermedades desatendidas: moléculas y trópico» pp: 49-74. Rodríguez de las Parras E., Rubio JM y Alvar J (Coordinadores). Ed Sial Pigmalión. 2015.
2. Torres-Guerrero E, *et al.* Leishmaniasis: a review. F1000 Research 2017; 6 :750.

3. Carstens-Kass J, *et al.* A review of the leishmanin skin test: A neglected test for a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021; 15(7): e0009531. doi:[10.1371/journal.pntd.0009531](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009531).
4. Deniau M *et al.* The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003; 97 Suppl 1: 115-33.
5. de Vries HJ, *et al.* Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol.* 2015; 16: 99-109.
6. Álvarez-Martínez MJ, *et al.* Diagnóstico de parasitosis importadas en España. Diagnóstico de parasitosis importadas en España. Álvarez-Martínez MJ (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (Eds). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2020.
7. Bangert M, *et al.* Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(3): e0006277.
8. Cruz I, *et al.* Comparison of new diagnostic tools for management of paediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(7): 2343-2347.
9. de Vries HJ y Schallig HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol.* 2022; 23(6): 823-840.
10. Gow I, *et al.* Laboratory diagnostics for human *Leishmania* infections: a polymerase chain reaction-focused review of detection and identification methods. *Parasit Vectors.* 2022; 15(1): 412.
11. Cruz I, *et al.* A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96 Suppl 1: S185-189.
12. Cruz I, *et al.* Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(7): 2343-7.
13. Fisa R, *et al.* A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96 Suppl 1: S191-4.
14. Chicharro C, *et al.* Molecular Diagnosis of Leishmaniasis in Spain: Development and Validation of Ready-To-Use Gel-Form Nested and

- Real-Time PCRs To Detect *Leishmania spp.* *Microbiol Spectr.* 2023; 11(3): e0335422.
15. Ibarra-Meneses AV, *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification Allows Rapid, Simple and Accurate Molecular Diagnosis of Human Cutaneous and Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* When Compared to PCR. *Microorganisms.* 2021; 9(3): 610. d.
  16. Molina R, *et al.* 2021. Programa de leishmaniasis humana en el área 9 de la Comunidad Autónoma de Madrid. pp: 156-165. En Echevarria JE, Oteo J (ed). Programas de vigilancia microbiológica. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Calos III.
  17. Prieto Tato LM, *et al.* Visceral childhood leishmaniasis: diagnosis and treatment. *An Pediatr (Barc).* 2010; 72(5): 347-51.
  18. Pintado V, *et al.* Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore).* 2001; 80(1): 54-73.
  19. Cardozo RS, *et al.* Cutaneous leishmaniasis: A pathological study of 360 cases with special emphasis on the contribution of immunohistochemistry and polymerase chain reaction to diagnosis. *J Cutan Pathol.* 2020; 47(11): 1018-1025.
  20. Garrido-Jareño M, *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: experience of a Mediterranean hospital. *Parasit Vectors.* 2020; 13(1): 24.

## CAPÍTULO 5

# Infección asintomática en el brote de leishmaniasis del suroeste de Madrid

Javier Moreno<sup>1,2</sup>, Laura Botana<sup>3</sup>, Ana Victoria Ibarra-Meneses<sup>4</sup>, José Carlos Solana<sup>1,2</sup>, Carmen Sánchez<sup>1,2</sup>, Sheila Ortega<sup>1</sup>, Javier Nieto<sup>1,2</sup>, Lorena Bernardo<sup>1,2</sup>, Ana María Torres<sup>1,2</sup>, Juan Víctor San Martín<sup>2,5</sup>, Jesús García-Martín<sup>6</sup>, Alicia Estirado<sup>7</sup>, Pello Latasa<sup>7</sup>, Juan Carlos Sanz<sup>8</sup>, Luis García-Comas<sup>7</sup>, Jorge Alvar<sup>9</sup>, María Ordobás<sup>7</sup>, Eugenia Carrillo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

<sup>3</sup> Departamento de Cardiología, Universidad Francisco de Vitoria/Unidad de Investigación del Hospital Ramón y Cajal (IRYCIS).

<sup>4</sup> Departamento de Patología y Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Montreal.

<sup>5</sup> Servicio de Medicina interna y Dermatología, Hospital Universitario de Fuenlabrada.

<sup>6</sup> Servicio de Laboratorio Clínico, Banco de Sangre, Hospital Universitario de Fuenlabrada.

<sup>7</sup> Departamento de Epidemiología, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid.

<sup>8</sup> Laboratorio Regional de Salud Pública, Comunidad de Madrid.

<sup>9</sup> Drugs for Neglected Disease initiative (DNDi).

## INTRODUCCIÓN

El brote comunitario de leishmaniasis en Madrid nos ha dado la oportunidad de estudiar en detalle uno de los aspectos más desconocidos de la epidemiología de esta infección como es la frecuencia de hospedadores asintomáticos y su papel en la transmisión del parásito. En efecto, el resultado de la infección por *Leishmania infantum* comprende un espectro de presentaciones clínicas que varía desde el estado de infección asintomática a la leishmaniasis visceral (VL) sintomática completa en

la que aparecen los síntomas clásicos ya descritos en otros capítulos del libro. En las zonas endémicas para leishmaniasis, la infección asintomática es mucho más frecuente que el desarrollo de la enfermedad, pero la ausencia de síntomas clínicos hace que estos casos pasen desapercibidos y sea difícil calcular su frecuencia de manera precisa (1).

Un factor que contribuye a este desconocimiento es la ausencia de pruebas de laboratorio específicas para identificar a los individuos asintomáticos. Como se recoge en el capítulo correspondiente de este libro, el diagnóstico de leishmaniasis está basado en diversas pruebas serológicas, capaces de determinar la presencia de anticuerpos específicos en suero y plasma de los pacientes, y pruebas parasitológicas que detectan la presencia del parásito o de su DNA. Pero en las personas asintomáticas, la respuesta humoral que causa la infección y la carga parasitaria son ambas tan bajas que las pruebas de diagnóstico antes mencionadas no sirven para identificarlas. Para superar este problema, en el Laboratorio de Leishmaniasis del CNM-ISCIH, Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis hemos estandarizado y validado pruebas de laboratorio que permiten detectar la respuesta celular específica frente al parásito de estos individuos. En efecto, en las personas asintomáticas, la ausencia de enfermedad se asocia al desarrollo de una respuesta eficiente de memoria celular que limita la dispersión y multiplicación del parásito y lo mantiene bajo control sin causar enfermedad. En estas circunstancias, los signos que indican que se ha producido una infección por *Leishmania* son la presencia de clones de células T que responden a la estimulación con los antígenos del parásito proliferando y produciendo citoquinas de perfil TH1 (2).

La prueba que tradicionalmente se ha utilizado en las encuestas epidemiológicas para determinar la exposición al parásito y la condición asintomático es el test intradérmico con leishmanina (LST de sus siglas en inglés), también llamado *test de Montenegro*. Esta prueba consiste en inocular una dosis de 10.000 promastigotes fenolizados de *Leishmania* (leishmanina) en la dermis del sujeto con el fin de desencadenar una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), que produce una induración en la zona de inoculación, debida a la acumulación de linfocitos que se produce en ese punto por el reconocimiento del parásito por el sistema inmune del individuo. Cuando el diámetro de la induración es mayor de 5 mm la respuesta celular es patente e indica que el sujeto ha sido infectado por el parásito en algún momento, pero permanece asintomático.

Actualmente, la ausencia de un reactivo de leishmanina elaborado siguiendo buenas prácticas de fabricación hace que no sea posible utilizar esta prueba LST para realizar encuestas epidemiológicas en la población humana. Para resolver el problema, hemos estandarizado dos pruebas de laboratorio en las que se utilizan

muestras de sangre periférica del sujeto y no hay que inocular ningún reactivo en la piel. Estas pruebas están incluidas en la Cartera de Servicios del Centro Nacional de Microbiología (*Boletín Oficial del Estado – 2019 pp 6028*) y están basada en la medición de los niveles de proliferación celular y producción de citoquinas como respuesta a la estimulación *in vitro* con antígenos de *Leishmania*:

### **Ensayo de proliferación celular *in vitro* – CPA**

Consiste en la estimulación *in vitro* de los linfocitos de sangre periférica con antígenos purificados de *Leishmania*, de forma que aquellas células T capaces de reconocer los antígenos del parásito se activan y proliferan. La proliferación celular se cuantifica midiendo la incorporación de nucleótidos para la síntesis de ADN que realizan las células del cultivo en división. El ensayo es positivo cuando se determina que el nivel de proliferación de las células estimuladas es significativamente mayor que el observado en las células sin estimular. Cuanto mayor es el índice de estimulación (proliferación células estimuladas/proliferación de células sin estimular) mayor es la respuesta celular frente al parásito. En estos cultivos es posible medir también la secreción al medio de citoquinas como IFN- $\gamma$ , asociadas a la inmunidad celular y cuyos niveles de expresión se correlacionan con el índice de estimulación.

### **Ensayo de estimulación de sangre completa - WBA**

Consiste en la estimulación directa de la sangre del sujeto que se realiza añadiéndola a un tubo con los antígenos purificados de *Leishmania*. Tras incubar 20-24 horas, se miden en el plasma de la muestra los niveles de citoquinas y quimioquinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, o IP-10, cuya alta producción está asociada con la activación específica de células T que reconocen los antígenos del parásito.

Ambas pruebas las hemos utilizado con éxito para el seguimiento de los pacientes con VL, ya que se pueden utilizar como test de cura para confirmar el desarrollo de una respuesta celular protectora después del tratamiento y para su seguimiento a largo plazo en los pacientes inmunodeprimidos en los que el riesgo de recaída es alto, línea de trabajo que se describe con detalle en otro capítulo de este libro. En este apartado mostraremos la utilidad de estas pruebas celulares de laboratorio para realizar encuestas epidemiológicas de la población afectada por el brote de leishmaniasis. Su utilización junto con las técnicas diagnósticas serológicas y parasitológicas, ha permitido establecer el porcentaje real de personas que han sido infectadas por *Leishmania* y han permanecido asintomáticas, lo que demuestra el nivel real de transmisión del parásito y de su impacto en la población (2).

En el contexto del brote comunitario de leishmaniasis en Fuenlabrada, nuestro laboratorio ha realizado dos encuestas epidemiológicas en la población de la ciudad con el fin de establecer la frecuencia de infección asintomática por *Leishmania*, un estudio realizado en donantes de sangre que acudieron al Banco de Sangre del Hospital Universitario de Fuenlabrada entre 2015 y 2017; y un estudio descriptivo transversal de leishmaniasis en Fuenlabrada llevado a cabo en el año 2015, incluido en la V Encuesta de Serovigilancia de la Comunidad de Madrid (3). Los resultados de ambas encuestas epidemiológicas se describen a continuación.

### **ESTUDIO EN DONANTES QUE ACUDEN AL BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE FUENLABRADA (2015-2017)**

Este estudio de la prevalencia de infección/exposición a *Leishmania* en individuos sanos se llevó a cabo en voluntarios del municipio que acudieron a donar sangre al Hospital de Fuenlabrada entre enero de 2015 y abril de 2017. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Hospital Universitario de Fuenlabrada y se solicitó el consentimiento informado por escrito a los voluntarios que acepten participar en el estudio. La fundación Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi (Ginebra, Suiza) financió el estudio a través de un contrato de investigación gestionado por la Fundación FCSAI del Ministerio de Sanidad.

El estudio tenía dos objetivos:

- Estudiar la prevalencia de infección por *Leishmania* en la población de donantes de sangre de Fuenlabrada.
- Identificar biomarcadores que definan el concepto de «portador asintomático» en el contexto de las diversas posibilidades (infectados, prepatente, portadores asintomáticos, asintomáticos protegidos y curados).

Estudios recientes indican que la combinación de diferentes procedimientos de laboratorio resulta la mejor aproximación para obtener un perfil de la infección asintomática completo (2). Siguiendo esta premisa, se analizaron los individuos de esta población diana (individuos sanos, de entre 18 y 65 años, sin historia previa de leishmaniasis clínica) utilizando métodos poco invasivos para encontrar individuos expuestos a la infección.

En el Banco de Sangre del hospital se obtuvo una muestra de sangre periférica heparinizada de 8-10 ml de cada voluntario incluido en el estudio. Esta muestra se trasladó al Laboratorio de Leishmaniasis del CNM-ISCIH, en Majadahonda, donde fue procesada en fresco para cada una de las pruebas de laboratorio que se llevaron a cabo y que se recogen en la [Tabla 1](#).

**Tabla 1. Pruebas diagnósticas para la identificación de individuos asintomáticos.**

Tipo de prueba	Técnica	Cantidad	Resultado	Marcador
Serológica	ICT-rK39	20 microL sangre/ plasma	Positivo/neg	Anticuerpos anti-rK39
	IFI	Plasma	Título antic. >1/80	Anticuerpos anti- <i>Leishmania</i>
Parasitológica	PCR	200 microL sangre	Positivo/neg	DNA ribosomal de <i>Leishmania</i> / kDNA
	Cultivo	100 microL sangre	Positivo/neg	Visualización de promastigotes vivos
Celular	Ensayo de proliferación CPA	5-6 ml sangre	Índice de estimulación IS > 2,31	Replicación del ADN
			Citoquinas en SN	Niveles de IL - 2, IL - 10, TNF - $\alpha$ , IFN - $\gamma$ , granzime B, IP-10
	Estimulación de sangre completa WBA	2 ml de sangre	Citoquinas en plasma	Niveles de IL - 2, IL - 10, TNF - $\alpha$ , IFN - $\gamma$ , granzime B, IP-10

Desde enero de 2015 hasta abril de 2017, se recibieron en nuestro laboratorio 612 muestras de sangre completa procedentes de 557 donantes que acudieron al Banco de Sangre del Hospital de Fuenlabrada y que aceptaron participar de forma voluntaria en el estudio. 55 muestras de sangre correspondieron a segundas o terceras tomas de muestras de los donantes reclutados.

- Análisis parasitológico. El cultivo en medio NNN de células mononucleares de sangre periférica y la PCR en sangre fueron negativos para todas las 612 muestras procesadas.
- Análisis serológico. El título positivo de la muestra por inmunofluorescencia indirecta (IFI) se estableció en >1/80. El estudio serológico por IFI detectó 3 donantes con anticuerpos IgG anti-*Leishmania* que también resultaron positivos por la prueba rápida ICT-rK39 (Kalazar Detect TM InBios). Estos individuos representan el 0,53% (3 de 557) de la población analizada y fueron invitados a donar posteriormente una nueva muestra de sangre (T2) para realizar un seguimiento en el tiempo que permitiera descartar el desarrollo de leishmaniasis en el futuro.

Estos tres individuos IFI+ también fueron positivos en los ensayos de proliferación celular. Los resultados obtenidos con la primera (T1) y la segunda muestra (T2) de sangre se resumen en la [Tabla 2](#). Los resultados parasitológicos fueron negativos en todas las muestras analizadas.

**Tabla 2. Caracterización inmunológica de los individuos asintomáticos IFAT+.**

Individuo	IFI		ICT-rK39		CPA (Índice the estimulación SI)		Intervalo T1-T2
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	
Asint 1	1/160±	< 1/40	+	-	2,630	4,193	62 días
Asint 2	1/160±	<1/40	+	-	8,298	6,806	4 meses
Asint 3	1/80 +/-	< 1/40	+	+	6,485	2,141	1 año

### Ensayo de proliferación celular in vitro - CPA

El ensayo de proliferación celular in vitro para SLA ha sido crucial para detectar los individuos que habían estado expuestos al parásito. El índice de estimulación (SI) para considerar el ensayo CPA positivo fue  $>2,31$ . Las muestras con SI entre 1,77 y 2,31 se consideraron dudosas y en estos casos se realizó el análisis de las citoquinas en el sobrenadante para precisar la situación del donante.

El ensayo de proliferación celular confirmó que 91 de los 557 donantes incluidos en el estudio presentaron respuesta celular específica frente al antígeno del parásito *Leishmania* (SLA) con SI mayor de 2.31. En 15 de los donantes analizados el SI fue dudoso y en estos casos se procedió a analizar los niveles de citoquinas en el sobrenadante del cultivo, resultando que en 8 de estos 15 individuos se observaron niveles altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Granzima B, IL-2 e IP-10, por lo que se consideraron individuos asintomáticos para leishmaniasis, mientras que en los 7 restantes no se observaron niveles significativos de estas citoquinas y estos individuos se consideraron negativos.

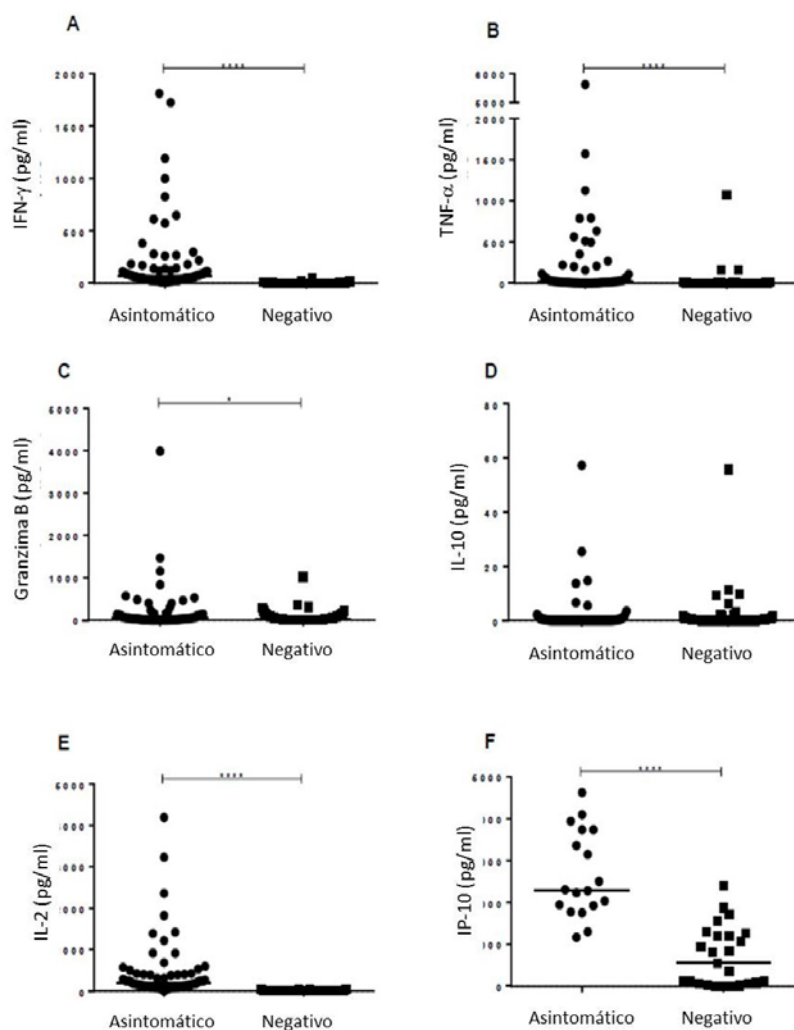
Con los datos obtenidos se puede calcular una prevalencia de infección asintomática para leishmaniasis en el grupo estudiado del 17,7% (99/557).

### Medición de citoquinas/quimioquinas en ensayo de estimulación de sangre entera con antígenos solubles de *Leishmania* - WBA

Se realizaron ensayos de estimulación de sangre completa con SLA con todas las muestras de sangre obtenidas y se llevaron a cabo análisis de expresión de citoquinas/quimioquinas en el plasma estimulado. Los niveles en plasma de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Granzima B, IL-2 e IP-10 aumentaron de forma significativa en los individuos asintomáticos en comparación con los donantes negativos que no responden a la estimulación, mientras que no se encontraron diferencias en cuanto a la producción de IL-10. En la [Figura 1](#) se muestra la diferencia de expresión de citoquinas entre los donantes asintomáticos

y los negativos. El ensayo de estimulación de sangre completa detectó 97 individuos asintomáticos (17,4%) entre los 557 donantes de sangre, mostrando una concordancia muy alta con los resultados obtenidos en la prueba CPA, y demuestra la idoneidad de la prueba WBA para encuestas epidemiológicas con un gran número de encuestados, en las que no es posible utilizar pruebas complejas de laboratorio como la CPA. El siguiente estudio epidemiológico que realizamos en Fuenlabrada y que describimos a continuación nos permitió confirmar definitivamente este punto.

**Figura 1. Producción de citoquinas/quimioquinas en sangre completa en respuesta a la estimulación con SLA durante 24 horas.** Se muestran los niveles de (A) Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), (B) Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), (C) Granzima B, (D) Interleuquina-10 (IL-10), (E) Interleuquina-2 (IL-2) y (F) proteína inducible-10 (IP-10) en plasma después de 24 h de estimulación con SLA de la sangre completa de participantes asintomáticos (n=72) y negativos (n=68). Las barras horizontales representan la mediana de las concentraciones para cada citoquina. Los datos se analizaron usando el test de Mann-Whitney U test. \* $p \leq 0.05$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .



## **ESTUDIO DESCRIPTIVO TRANSVERSAL DE LEISHMANIASIS EN FUENLABRADA (2015), INCLUIDO EN LA V ENCUESTA DE SEROVIGILANCIA DE LA COMUNIDAD DE MADRID**

El objetivo de la encuesta es determinar la prevalencia y los factores de riesgo asociados con la infección asintomática por *Leishmania* en el municipio de Fuenlabrada tras el brote de 2009. Consistió en un estudio descriptivo transversal realizado de enero a julio de 2015 en el marco de la V Encuesta Sero-epidemiológica de la Comunidad de Madrid. Esta encuesta general se hace periódicamente para conocer la situación de enfermedades inmunoprevenibles incluidas en el calendario vacunal y de otras enfermedades infecciosas en las que son característicos largos periodos sin síntomas. Ante el brote de leishmaniasis comunitario ocurrido en Fuenlabrada y otros municipios, la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid decidió incluir en la V Encuesta la determinación de anticuerpos frente a *Leishmania* y de la respuesta inmune celular con el fin de conocer el estado inmunitario de la población frente a este patógeno. Esta encuesta se realizó en toda la Comunidad de Madrid (4050 encuestados), pero en este capítulo vamos a hacer referencia solo a los datos de prevalencia obtenidos en el municipio de Fuenlabrada, en el que se amplió la muestra de sujetos encuestados con fin de obtener una visión más completa de la situación epidemiológica en la zona (3).

La población objetivo fueron personas residentes en Fuenlabrada. La muestra de estudio se formó de personas que acudieron a los centros públicos de atención primaria de salud de Fuenlabrada. Se reclutó a un total de 804 personas en los centros de atención primaria de El Naranjo, Castilla la Nueva, Cuzco, Alicante, Panaderas, Francia y Parque Loranca. Se hizo un muestreo aleatorio de los siguientes grupos de edad: menos de 2 años, 2 a 5 años, 6 a 10 años, 11 a 15 años, 16 a 20 años, 21 a 30 años, 31 a 40 años, 41 a 60 años y más de 60 años. De la encuesta se excluyeron todas las personas con una condición que pudiera causar inmunosupresión, o que habían experimentado cualquier episodio clínico de leishmaniasis.

De cada participante se tomó una muestra de sangre periférica y completó un cuestionario en el que se registraba edad, sexo, país de nacimiento, nivel de ingresos, historial médico y su conocimiento de los problemas de salud (es decir, ingesta de inmunosupresores, infecciones como VIH o hepatitis) y medidas preventivas contra leishmaniasis.

Cada muestra de sangre se analizó mediante PCR y estimulación de sangre completa para determinar expresión de IL-2 (Tabla 1). Además, se obtuvo suero de la muestra en el que se determinó el título de anticuerpos séricos específicos para *Leishmania* mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y la técnica

de aglutinación directa (DAT), prueba que se utiliza habitualmente en estudio sero-epidemiológicos.

Los resultados obtenidos en la encuesta se muestran en la [Tabla 3](#), donde se recogen los datos por centro de salud y técnica realizada.

**Tabla 3. Prevalencia de infección asintomática por Centros de Atención Primaria.**

Centro de Salud	N.º Personas encuestadas	Número de positivos para cada prueba (%)			
		WBA*	IFI	DAT	PCR
A - Alicante	132	27 (20,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
B - Castilla la Nueva	123	37 (30,1%)	1 (0,81%)	3 (2,4%)	0 (0%)
C - Cuzco	94	20 (21,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
D - El Naranjo	120	40 (33,6%)	0 (0%)	2 (1,7%)	0 (0%)
E - Francia	140	11 (7,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
F - Panaderas	117	19 (16,2%)	0 (0%)	2 (1,7%)	0 (0%)
G - Parque Loranca	78	10 (12,7%)	0 (0%)	1 (1,3%)	0 (0%)
<b>TOTAL</b>	<b>804</b>	<b>164 (20,4 %)</b>	<b>1 (0.12%)</b>	<b>8 (0,99%)</b>	<b>0 (0%)</b>

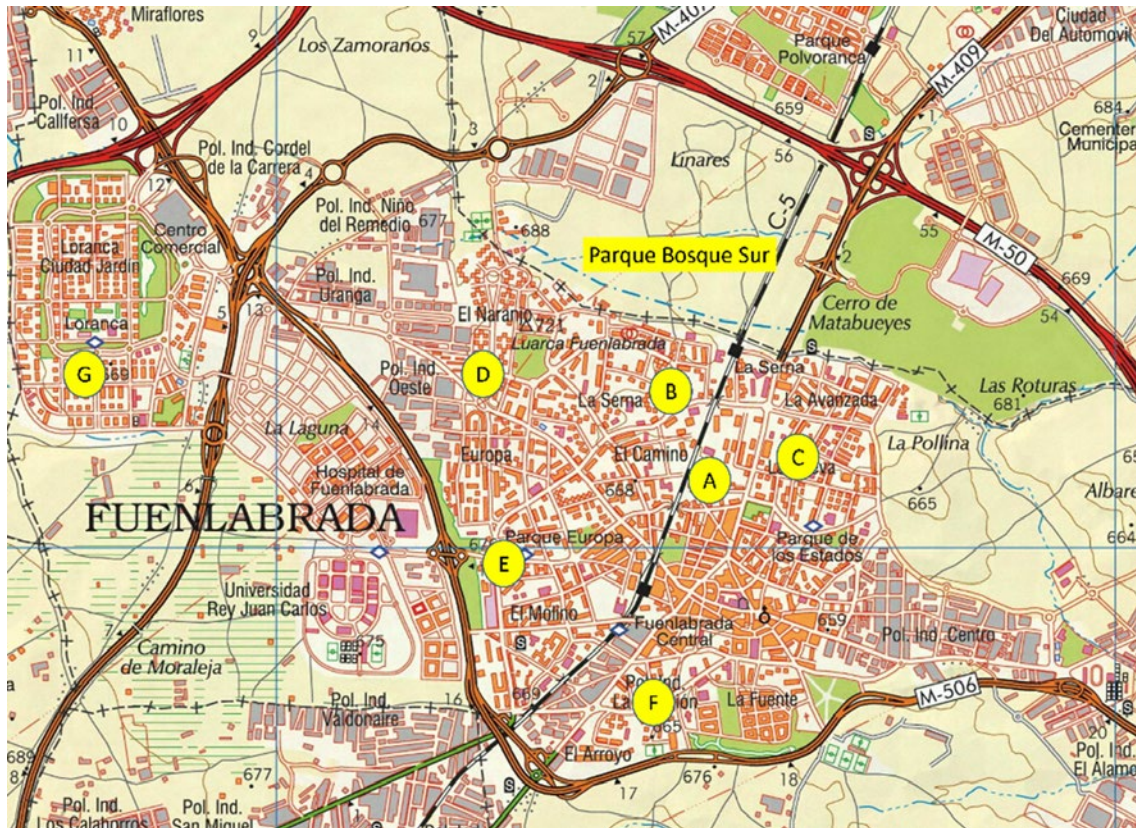
\* En la prueba de estimulación de sangre completa (WBA) se tomó como referencia los niveles de expresión de la citoquinas IL-2 para determinar la respuesta positiva o negativa.

Los resultados muestran que, en el momento de la encuesta, hasta un 20.4% (164/804) de las personas viviendo en Fuenlabrada tenían respuesta celular específica frente al parásito, tal y como indicaba el test de estimulación de sangre completa, mientras que los niveles de seroprevalencia medidos por IFI y DAT fueron el 0,12% (1/804) y el 0,99% (8/804) respectivamente, lo que indica un acuerdo muy bajo entre las técnicas celulares y humorales y confirma la necesidad de utilizar ambos tipos de pruebas para determinar la prevalencia real de infección asintomática en una zona endémica (4).

De la misma forma que se observó con la incidencia de casos clínicos reportada por Arce y col. 2013 (5), el estudio transversal mostró que la prevalencia de infección asintomática fue más alta entre los sujetos que acudían a los centros de atención primaria cercanos al parque Bosquesur, considerado el foco de la infección por ser el lugar donde habitaban las liebres y conejos que actuaron de reservorio del parásito (véase el primer capítulo del libro). Como se muestra en la [Figura 2](#), los centros más cercanos al parque mostraron las prevalencias más altas: El Naranjo, 33,6%; Castilla la Nueva, 30,1%; Cuzco, 21,3%; y Alicante, 20,3%; mientras que era significativamente más baja en los centros de atención primaria más alejados del parque: Panaderas, 16,8%; Parque Loranca, 12,7% y Francia, 8%. La cercanía

de la vivienda al parque Bosquesur constituye por tanto un factor de riesgo que predispone a la infección en esta área.

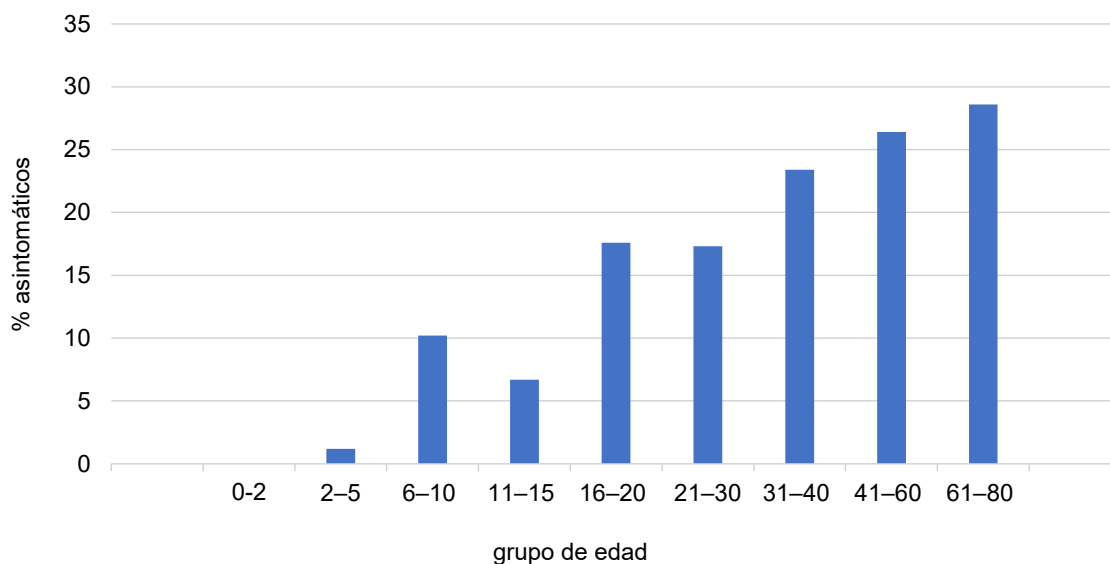
**Figura 2. Mapa de Fuenlabrada en el que se muestra la situación de los diferentes centros de salud del municipio.** Se puede observar la distancia relativa de cada uno de ellos al parque Bosque Sur, considerado el foco de la infección. Centros de Salud: A: Alicante, B: Castilla la Nueva, C: Cuzco, D: El Naranjo, E: Francia, F: Panaderas y G: Parque Loranca.



Encontramos también diferencias significativas en la distribución de los sujetos asintomáticos en función de la edad, el sexo, país de origen y tipo de vivienda. Observamos que la frecuencia de infección asintomática aumentaba de forma significativa con la edad, tal y como se muestra en la [Figura 3](#). El porcentaje de infección asintomática fue significativamente mayor en hombres (28,2 %), que en mujeres (13,2%). La prevalencia entre los sujetos de origen español encuestados (762) fue del 21,5% mientras que entre los extranjeros (35) alcanzó el 7,2%. Según el tipo de vivienda, observamos que el porcentaje de asintomáticos entre los sujetos que vivían en apartamentos era del 19,5%, mientras que alcanzaba el 34,5% entre aquellos que vivían en casa unifamiliares. La encuesta también reveló que la prevalencia de

infección asintomática era mayor entre las personas que tenían contacto con perros y las personas que habían tenido contacto con perros y gatos enfermos.

**Figura 3. Prevalencia de infección asintomática por grupos de edad en el municipio de Fuenlabrada.**



Además de los mencionados, en la encuesta se incluyeron otros factores cuyo análisis detallado se recoge en la publicación de Ibarra-Meneses y col. 2019 (6).

Los resultados de los dos estudios realizados confirman que a lo largo del brote de leishmaniasis comunitario, un alto porcentaje de la población del municipio ha estado expuesta y ha sido de hecho infectada por el parásito *Leishmania*, y que la gran mayoría de estas personas no han desarrollado ningún tipo de signo clínico ni enfermedad. Los porcentajes de infección asintomática obtenidos en cada uno de los estudios descritos son similares: 17,7% en los donantes del Banco de Sangre de Fuenlabrada, y 20,4% en la población general del municipio, lo que refuerza la consistencia de los resultados obtenidos. La [Tabla 4](#) muestra de forma resumida los datos obtenidos con las diferentes pruebas moleculares, serológicas y celulares utilizadas para identificar los sujetos asintomáticos en Fuenlabrada.

**Tabla 4. Número y porcentaje de individuos asintomáticos detectados por las diferentes pruebas en cada encuesta epidemiológica.**

Población de estudio	Pruebas moleculares	Pruebas serológicas		Pruebas celulares	
	PCR+ (%)	IFAT+ (%)	DAT+ (%)	WBA (IL-2)+ (%)	CPA+ (%)
Población general N=804	0 (0%)	1 (0.11 %)	9 (1.11%)	166 (20.6%)	
Donantes de sangre N=577	0 (0%)	3 (0,52%)		97 (17.4%)	99 (17,7%)

Las pruebas de laboratorio utilizadas habitualmente para identificar una infección asintomática por *Leishmania* han sido las serológicas, IFI, DAT o pruebas rápidas diagnósticas, que detectan anticuerpos específicos contra el parásito (7). Los métodos moleculares como la PCR también se han utilizado para identificar infecciones asintomáticas, pero con menor frecuencia, debido a la dificultad para realizar dichos análisis en el campo. Ensayos celulares como la prueba cutánea de leishmanina (LST), han sido utilizado ampliamente en encuestas epidemiológicas (1,4,8,9,10), mientras que los ensayos de estimulación de sangre total (WBA) ha demostrado ser útil para identificar infecciones asintomáticas tanto por *L. infantum* como *L. donovani* (11,12,13,14). Su sencillez, rapidez y no necesitar condiciones estériles o equipos sofisticados, la convierten en una práctica herramienta de campo que puede sustituir al LST, que resulta más invasivo para el sujeto encuestado.

Los estudios epidemiológicos realizados en áreas endémicas para leishmaniasis visceral muestran que la mayoría de las personas infectadas no muestran signos ni síntomas de la enfermedad pero dicha proporción de sujetos asintomáticos/sintomáticos es variable y depende de las condiciones eco-epidemiológicas y sociales en cada región (15). En África se han reportado ratios de individuos asintomáticos en relación a los casos activos de leishmaniasis visceral que varían entre 2,4:1 en Sudan a 5,6:1 en Etiopía, mientras que en Asia las proporciones varían entre 4:1 en Bangladesh a 8,9:1 en India y Nepal (7,16,17), y en América del Sur se ha descrito una relación de 18:1 para Brasil (15). Estas variaciones reflejan las diferencias en la virulencia del parásito y las características del huésped, además de otros factores sociales y ambientales, pero quizás también las asociadas con el diseño del estudio y las pruebas utilizadas para identificar los pacientes asintomáticos.

En España no existían datos precisos sobre la relación entre el número de sujetos asintomáticos y sintomáticos en los focos de leishmaniasis, aunque se ha hecho una estimación muy general de 50 individuos asintomáticos por cada caso activo de leishmaniasis visceral (15). En este momento, las encuestas epidemiológicas realizadas

en el municipio de Fuenlabrada si nos permiten hacer un cálculo preciso y real sobre la proporción real de individuos asintomáticos/sintomáticos en la zona. Considerando que la prevalencia de infección asintomática obtenida en la encuesta aleatoria realizada sobre la población total de Fuenlabrada es del 20,4% y que la población total del municipio en 2015, año en que se realizó dicha encuesta, era de 195.180 habitantes, según datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (18), se puede calcular que hasta ese año el número acumulado de personas asintomáticas en Fuenlabrada era de 39.800 personas aproximadamente. Por otro lado, los casos clínicos de leishmaniasis reportados hasta 2015 en Fuenlabrada por la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid fueron 516 (172 de leishmaniasis visceral y 344 de leishmaniasis cutánea), lo que nos permite establecer que por cada caso activo de leishmaniasis en el municipio han habido 77 casos asintomáticos, y si consideramos solo los casos de leishmaniasis visceral, esta proporción sube a 231 sujetos asintomáticos por cada caso de leishmaniasis visceral activa, una relación bastante mayor que la estimada hasta ahora para España y que la observada en otras zonas endémicas del planeta (1,4,16).

La alta frecuencia de casos asintomáticos observados en nuestros estudios deja patente el alto nivel de transmisión de parásito que ha tenido lugar en la zona durante el brote de leishmaniasis, lo que viene apoyado por la gran cantidad de datos recogidos en los diferentes capítulos de este libro. Pero también hay que destacar que a pesar del alto número de casos de leishmaniasis activa asociado con este brote, el número de personas infectadas que no desarrollaron ningún síntoma de leishmaniasis ha sido mucho mayor, confirmando la idea ya expuesta de que, al menos en nuestro entorno, la inmensa mayoría de las personas infectadas por *Leishmania infantum* no desarrollan la enfermedad.

Una vez establecida la alta frecuencia de infección asintomática en el municipio de Fuenlabrada, se planteó la cuestión de cuál podría ser, si es que lo tenían, su papel epidemiológico en la dinámica de transmisión del parásito. Con el fin de abordar esta interrogante, y aprovechando el estudio epidemiológico en donantes de sangre, se realizaron xenodiagnósticos indirecto en las muestras de sangre obtenidas de los donantes asintomáticos incluidos en el estudio, para determinar la capacidad de infección a flebótomos que pudieran tener estos sujetos. Este trabajo se recoge con detalle en el capítulo sobre xenodiagnóstico de este libro, solo mencionar aquí que los resultados mostraron que los sujetos asintomáticos no eran infectivos a los flebótomos ya que su carga parasitaria en sangre era indetectable, tal y como se observaba también en los resultados negativos de PCR obtenidos tanto en sujetos asintomáticos del banco de sangre como en los sujetos encuestados en la SEROVI, en ninguno de ellos se detectó parásitos (Tabla 4). Por todo ello cabe pensar que

los individuos infectados asintomáticos no tienen un rol activo en la transmisión de *L. infantum* (19).

## INFECCIÓN ASINTOMÁTICA EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS

Un aspecto que se ha revelado crucial dentro de las actividades llevadas a cabo por los laboratorios del Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis ha sido el seguimiento postratamiento de los pacientes inmunodeprimidos con leishmaniasis visceral y la evaluación del riesgo de recaída en dichos pacientes, aspecto que se describe con detalle en otro capítulo de este libro.

Los pacientes inmunodeprimidos presentan un mayor riesgo de desarrollar leishmaniasis si se infectan con el parásito (20). En la actualidad, buena parte de los casos de leishmaniasis visceral reportados en nuestro país se asocian con una condición de inmunosupresión, llegando incluso a aparecer en forma de brote, como el ocurrido entre pacientes suecos inmunodeprimidos durante una estancia de reposo en nuestro país (21). En el brote de leishmaniasis en Fuenlabrada, buena parte de los pacientes con VL tenían una condición de inmunosupresión asociada (5), y pudimos calcular que, independientemente del tipo de condición, la probabilidad que tenían estos pacientes de desarrollar VL activa tras la infección era 100 veces mayor que la de los sujetos inmunocompetentes. Ante esta situación nos preguntamos cuál podría ser la prevalencia de infección asintomática entre estos individuos, cuál era el riesgo real que tenían de desarrollar leishmaniasis a largo plazo y si podría haber diferencias entre los grupos de pacientes dependiendo del tipo de inmunosupresión.

En colaboración con los clínicos del Hospital Universitario de Fuenlabrada y del Hospital 12 de Octubre de Madrid, establecimos tres cohortes de pacientes inmunodeprimidos: pacientes VIH+, pacientes receptores de trasplantes de órgano sólido y pacientes con enfermedades autoinmunes bajo tratamiento inmunosupresor. Estudiamos la prevalencia de infección asintomática en estos grupos e hicimos un seguimiento para determinar cuántos de estos pacientes desarrollan leishmaniasis a lo largo del tiempo. En la [Tabla 5](#) se muestran los porcentajes de sujetos asintomáticos hallados para cada uno de los grupos de pacientes detectados con las diferentes pruebas de laboratorio, PCR, serológicas y celulares.

**Tabla 5. Datos de infección asintomática observados en diferentes grupos de pacientes inmunodeprimidos.**

GRUPO	PCR	Serología	Respuesta celular
Pacientes HIV+ N=123	0 (0%)	0 (0%)	19 (15.4%)
Pacientes con tratamiento inmunodepresor N=85	0 (0%)	0 (0%)	23 (27.0%)
Receptores de trasplantes de órgano sólido N=57	0 (0%)	2 (3.5%)	12 (21.0%)
Donantes de sangre (inmunocompetentes) N=557	0 (0%)	5 (0.88%)	99 (17,7%)

Los resultados obtenidos muestran que la prevalencia de infección asintomática fue similar entre las diferentes cohortes de pacientes analizadas y que a su vez era similar a la observada en pacientes inmunocompetentes, lo que indicaría que la prevalencia de infección asintomática está relacionada con la probabilidad de ser picado por el flebótomo infectado. Como ya se ha mencionado anteriormente, la probabilidad de infección dependía en mayor medida de la cercanía al parque Bosquesur que del estado inmunológico del sujeto (22).

Estos datos también demuestran por primera vez que los ensayos de liberación de citoquinas tras la estimulación con SLA son idóneos para identificar una infección asintomática por *Leishmania* en pacientes inmunodeprimidos con diferentes condiciones, tanto VIH+ (23), receptores de trasplantes de órgano sólido (24) o bajo tratamiento inmunosupresor para enfermedades autoinmunes (25). En todos estos casos comprobamos que las pruebas eran específicas y los resultados positivos correspondían al reconocimiento específico de los antígenos de *Leishmania*.

La infección asintomática en individuos inmunodeprimidos constituye un factor a tener en cuenta en el manejo clínico de estos pacientes ya que a largo plazo, y conforme se reducen los niveles de inmunidad, existe un riesgo de desarrollar leishmaniasis activa. Este tipo de pruebas son por tanto recomendables para aquellas personas que viven en focos de transmisión del parásito y que sufren o van a sufrir a corto plazo una inmunosupresión programada. No obstante, también hay que decir que de aquellos pacientes inmunodeprimidos que identificamos hace ya años como asintomáticos, no tenemos conocimiento hasta el momento de que alguno haya desarrollado leishmaniasis activa. Por ello, lo que si podemos decir es que aunque existe, el riesgo de desarrollar leishmaniasis en estos pacientes es bajo o muy bajo,

debido probablemente a que, a pesar de su menor capacidad inmunológica, si son capaces de mantener a largo plazo la respuesta celular frente al parásito (23,24,25).

## REFERENCIAS

1. Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, *et al.* Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(4):334-7.
2. Ibarra-Meneses AV, Moreno J, Carrillo E. New strategies and biomarkers for the control of visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2020; 36(1):29-38.
3. *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid. 2021, Volumen 26. Suplemento. V Encuesta de Serovigilancia de la Comunidad de Madrid.* <https://gestion3.madrid.org/bvirtual/BVCM050684.pdf>
4. Sordo L, Gadisa E, Custodio E, Cruz I, Simón F, Abraham Z, Moreno J, Aseffa A, Tsegaye H, Nieto J, Chicharro C, Cañavate C. Low prevalence of *Leishmania* infection in post-epidemic areas of Libo Kemkem, Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(6):955-8.
5. Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, *et al.* Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013; 18(30):20546.
6. Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Nieto J, Sánchez C, Ortega S, Estirado A, Latasa P, Sanz JC, García-Comas L, Ordobás M, Moreno J. Prevalence of asymptomatic *Leishmania* infection and associated risk factors, after an outbreak in the south-western Madrid region, Spain, 2015. *Euro Surveill.* 2019; 24(22):pii=1800379.
7. Topno RK, Das VN, Ranjan A, Pandey K, Singh D, Kumar N, *et al.* Asymptomatic infection with visceral leishmaniasis in a disease-endemic area in Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83(3):502-6.
8. Hailu A, Gramiccia M, Kager PA. Visceral leishmaniasis in Aba-Roba, south-western Ethiopia: prevalence and incidence of active and subclinical infections. *Ann Trop Med Parasitol.* 2009; 103(8):659-70.
9. Babuadze G, Alvar J, Argaw D, de Koning HP, Iosava M, Kekelidze M, *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in Georgia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(3):e2725.

10. Werneck GL, Rodrigues L Jr, Santos MV, Araújo IB, Moura LS, Lima SS, *et al.* The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil *Acta Trop.* 2002; 83(1):13-8.
11. Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Sánchez C, García-Martínez J, López Lacomba D, San Martín JV, *et al.* Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22(8):739.e1-4.
12. Ibarra-Meneses AV, Ghosh P, Hossain F, Chowdhury R, Mondal D, Alvar J, *et al.* IFN- $\gamma$ , IL-2, IP-10, and MIG as Biomarkers of Exposure to *Leishmania* spp., and of Cure in Human Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:200.
13. Ibarra-Meneses AV, Sanchez C, Alvar J, Moreno J, Carrillo E. Monocyte Chemotactic Protein 1 in Plasma from Soluble *Leishmania* Antigen-Stimulated Whole Blood as a Potential Biomarker of the Cellular Immune Response to *Leishmania infantum*. *Front Immunol.* 2017; 8:1208.
14. Gidwani K, Jones S, Kumar R, Boelaert M, Sundar S. Interferon gamma release assay (modified QuantiFERON) as a potential marker of infection for *Leishmania donovani*, a proof of concept study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(4):e1042.
15. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(11):873-82.
16. Bern C, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, Vaz L, *et al.* The epidemiology of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(5):909-14.
17. Ostryn B, Gidwani K, Khanal B, Picado A, Chappuis F, Singh SP, *et al.* Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(10):e1284.
18. Instituto Nacional de Estadística. 2023. <https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=2881&L=0>
19. Molina R, Jiménez M, García-Martínez J, San Martín JV, Carrillo E, Sánchez C, Moreno J, Alves F, Alvar J. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniasis in a Mediterranean context. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14(4):e0008253.

20. Akuffo H, Costa C, van Griensven J, Burza S, Moreno J, Herrero M. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(5):e0006375.
21. Hammarström H, Moreno J, Dotevall L, Calander AM. *Leishmania infantum* infection after visiting southern Spain in patients on biological treatment; an observational, longitudinal, cohort study. *Travel Med Infect Dis*. 2023; 53:102570.
22. Carrasco-Antón N, López-Medrano F, Fernández-Ruiz M, Carrillo E, Moreno J, García-Reyne A, Pérez-Ayala A, Rodríguez-Ferrero ML, Lumbreras C, San-Juan R, Alvar J, Aguado JM. Environmental Factors as Key Determinants for Visceral Leishmaniasis in Solid Organ Transplant Recipients, Madrid, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(7):1155-1159.
23. Botana L, Ibarra-Meneses AV, Sánchez C, Castro A, San Martín JV, Molina L, Ruiz-Giardín JM, Carrillo E, Moreno J. Asymptomatic immune responders to *Leishmania* among HIV positive patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(6):e0007461.
24. Carrasco-Antón N, Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Fernández-Ruiz M, Hernández-Jiménez P, Aguado JM, Moreno J, López-Medrano F. An exploratory analysis of C-X-C motif chemokine ligand 10 as a new biomarker of asymptomatic *Leishmania infantum* infection in solid-organ transplant recipients. *J Infect*. 2022; 84(4):573-578.
25. Botana L, Ibarra-Meneses AV, Sanchez C, Matia B, San Martín JV, Moreno J, Carrillo E. Leishmaniasis: A new method for confirming cure and detecting asymptomatic infection in patients receiving immunosuppressive treatment for autoimmune disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15(8):e0009662.

## CAPÍTULO 6

# Seguimiento de pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos en el contexto del brote comunitario de leishmaniasis en el suroeste de Madrid

Eugenia Carrillo<sup>1,2</sup>, Laura Botana<sup>3</sup>, José Carlos Solana<sup>1,2</sup>, Carmen Sánchez<sup>1,2</sup>, Ana Victoria Ibarra-Meneses<sup>4</sup>, Lorena Bernardo<sup>1,2</sup>, Ana María Torres<sup>1,2</sup>, Alba Lain<sup>1</sup>, Alicia Castro<sup>5</sup>, Luis Horrillo<sup>5</sup>, Francisco López-Medrano<sup>2,6</sup>, José María Aguado<sup>2,6</sup>, Juan Víctor San Martín<sup>2,5</sup>, Javier Moreno<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

<sup>3</sup> Departamento de Cardiología, Universidad Francisco de Vitoria/Unidad de Investigación del Hospital Ramón y Cajal (IRYCIS).

<sup>4</sup> Departamento de Patología y Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Montreal.

<sup>5</sup> Servicio de Medicina interna y Dermatología, Hospital Universitario de Fuenlabrada.

<sup>6</sup> Hospital Universitario 12 de Octubre.

## SITUACIÓN ACTUAL DEL SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS VISCERAL

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoos del género *Leishmania* que se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial. Cualquier condición inmunosupresora convierte a la población expuesta en altamente susceptible de desarrollar una leishmaniasis visceral (LV) más severa y con sucesivas recaídas tras el tratamiento antiparasitario (1).

Además, existen problemas clínicos particulares en el manejo de pacientes inmunosuprimidos con leishmaniasis visceral.

- En pacientes LV con infección concomitante por el virus VIH (VIH-LV), el tratamiento antiparasitario profiláctico se inicia tras el tratamiento de la leishmaniasis y puede ser administrado de forma crónica, ya que no se conoce cuándo es seguro retirar dicha profilaxis secundaria. En estos pacientes es fundamental saber cuándo se produce la cura de la LV para suspender el tratamiento antiparasitario profiláctico.
- A pacientes LV en tratamiento con fármacos inmunosupresores (IS) debido a enfermedades autoinmunes, se les retira dicha terapia inmunosupresora con el objetivo de que el tratamiento frente a la LV sea efectivo. En estos pacientes es fundamental conocer en qué momento concreto se produce la cura de la LV para poder realizar la reintroducción del fármaco IS retirado durante el tratamiento de la leishmaniasis.
- Es importante también destacar que el número de pacientes con trasplante de órgano sólido (TOS) con LV (TOS-VL) se ha multiplicado en la última década, y su situación crónica de inmunosupresión agrava la posibilidad de infección grave o recaída, pudiendo comprometer la evolución del órgano trasplantado. Por ese motivo, es crucial conocer si realmente el paciente TOS ha curado tras el tratamiento.

En este contexto es prioritario disponer de técnicas que permitan determinar en qué momento del tratamiento se produce la cura de la leishmaniasis visceral. Actualmente la OMS considera que un paciente de leishmaniasis visceral está curado si a los 6 meses tras el tratamiento no ha recaído. No obstante, esta medida es poco acertada para pacientes con inmunosupresión debido a las recurrentes recaídas que sufren, la mayoría de ellas en los primeros meses tras el tratamiento.

Los ensayos diagnósticos convencionales son muy útiles para la detección de la respuesta humoral policlonal producida frente a *Leishmania* mediante la detección de anticuerpos frente a la proteína del parásito k39 mediante tira cromatográfica (rK39-ICT) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Igualmente, es clave la realización de la detección molecular del parásito (PCR) para conocer la presencia parasitaria en sangre o médula ósea. Debido a la persistencia de los anticuerpos tras la cura de la LV y a que el diagnóstico molecular de *Leishmania* generalmente está asociado a la aparición de sintomatología, estas técnicas de inmunología humoral y de detección molecular no son técnicas realmente útiles para la evaluación de la cura tras el tratamiento.

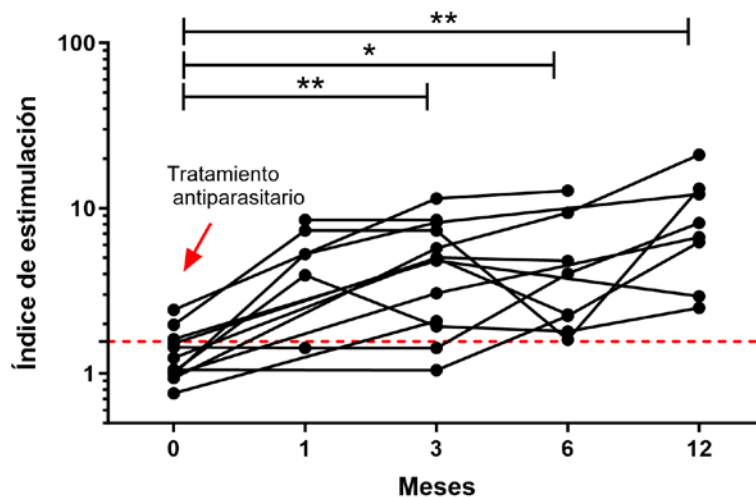
Para la resolución efectiva de la LV es fundamental la generación de memoria inmunológica celular. La cura y la resistencia a la enfermedad causada por *Leishma-*

*nia* spp se produce por la acción de una respuesta celular específica de tipo Th1 que activa los macrófagos infectados para eliminar a los parásitos (2).

Con el objetivo de conocer el estado inmunológico del individuo, en nuestro trabajo de laboratorio también realizamos la técnica de linfoproliferación celular *in vitro* (CPA) y el test rápido de respuesta WBA (BOE-A-2019-6028), ambas empleando el antígeno soluble de *Leishmania* (SLA). A modo de prueba de concepto, hicimos un estudio sobre la utilidad de estas técnicas en el seguimiento de pacientes inmunocompetentes con LV, ya que suelen curar sin recaídas en el 98% de los casos tras el tratamiento.

En los ensayos realizados en estos pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral (n=10), observamos que la capacidad de proliferación celular CPA frente al antígeno SLA, ausente en el momento activo de la enfermedad, se alcanza en los meses posteriores al inicio del tratamiento (Figura 1). Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de estas técnicas específicas para el seguimiento de pacientes con LV.

**Figura 1. Seguimiento de pacientes inmunocompetentes utilizando el ensayo de proliferación celular (CPA).** Se realizó el test antes de recibir el tratamiento y 1, 3, 6 y 12 meses después del tratamiento \*(p < 0,05) y \*\* (p < 0,01). Se muestra el índice de estimulación específico (antígeno SLA) respecto al control no estimulado. La línea roja discontinua indica el punto de corte de la técnica, obtenido tras realizar el mismo ensayo en personas sanas sin leishmaniasis.



Además, se observa que todos los individuos inmunocompetentes manifestaban una respuesta celular específica en el tiempo estimado por la OMS para la cura (6 meses), aunque el 84% de los pacientes curaron en los tres primeros meses. Estos resultados indican que la mayoría de los pacientes de LV curan antes del tiempo

establecido por la OMS y, por tanto, resaltan la necesidad de un seguimiento personalizado de cada paciente con LV.

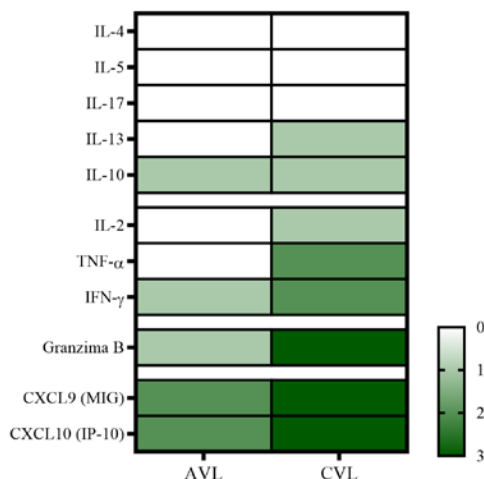
Por otro lado, tal y como está previamente descrito, las técnicas convencionales de diagnóstico serológicas y parasitológicas no fueron útiles para establecer la cura tras el tratamiento (Tabla 1).

**Tabla 1. Resultado de las pruebas diagnósticas en cartera de servicio del ISCIII en el seguimiento de pacientes inmunocompetentes con LV.** Se realizó el seguimiento de los pacientes en el momento activo (mes cero, M0), y tras el tratamiento a diferentes meses (M1, M3, M6) hasta 12 meses (M12).

Técnica	Pacientes con resultado positivo (%)				
	M0	M1	M3	M6	M12
PCR	100	0	0	0	0
rk39-ICT	77	40	67	50	50
IFI	92	60	86	63	50
CPA	0	80	84	100	100

Además del ensayo de proliferación celular (CPA), el test de cura rápida WBA también permite establecer el momento de la cura de LV. Su realización es más sencilla y rápida, y puede realizarse fácilmente en puntos de atención al paciente. Tras la estimulación de la sangre completa con antígeno SLA durante 24 horas, se miden las citoquinas en ese plasma estimulado. Aunque normalmente se considera la producción específica de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IP-10 asociados al éxito del tratamiento (CVL) de la LV activa (AVL), a continuación en la figura 2 se muestran diferentes citoquinas relacionadas con la cura (3). Algunas de estas citoquinas pueden además medirse desde papel de filtro, facilitando aún más su uso en áreas remotas con escasos recursos (4).

**Figura 2. Nivel de citoquinas específicas de pacientes inmunocompetentes con LV activa (AVL) y curados (CLV) utilizando el test rápido de respuesta WBA.** Se muestra una graduación de mayor (nivel 3) a menor (nivel 0) de expresión.



Una vez establecidas una serie de técnicas (CPA y WBA) que apoyan el seguimiento clínico del tratamiento de pacientes inmunocompetentes con LV, se realizó un estudio para conocer su utilidad en el seguimiento de pacientes inmunosuprimidos. La aplicación de las técnicas de diagnóstico convencional y de inmunología celular en muestras de sangre de individuos inmunosuprimidos con LV residentes en la zona del brote de Fuenlabrada, ha permitido realizar el seguimiento en el tiempo de estos individuos, contribuir al conocimiento de su estado clínico, parasitológico e inmunológico, así como a la toma de decisiones sobre su tratamiento.

## POBLACIÓN ESTUDIO

El estudio de los pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de Fuenlabrada (APR12-65 y APR14-64), y todos los pacientes eran adultos y dieron su consentimiento escrito para la realización de las pruebas dentro de este estudio.

En el periodo comprendido entre 2013 y 2019, se realizó el seguimiento durante más de dos años (en algunos casos más de 10 años) de 22 pacientes inmunosuprimidos con LV: 7 coinfectados con VIH (en terapia TARGA) y 15 con tratamiento inmunosupresor por enfermedad autoinmune. Además, se realizó un estudio para confirmar la cura de 6 pacientes con trasplante de órgano sólido (TOS) que tras sufrir LV, habían recibido el tratamiento antiparasitario y habían sido dados de alta de leishmaniasis.

En 10 ml de sangre, se realizaron las pruebas diagnósticas en cartera de servicio del Centro Nacional de Microbiología (CNM, ISCIII): detección molecular del parásito (PCR), detección de anticuerpos mediante rK39-ICT y la técnica IFI, y los ensayos celulares CPA y WBA (BOE-A-2019-6028). La metodología para realizar estas pruebas está descrita en diversos artículos científicos (5,6).

Para el análisis estadístico, se realizaron estudios de normalidad de las distribuciones de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre los diferentes grupos. La significación estadística se estableció en  $p < 0,050$ .

## RESULTADOS EN PACIENTES TRASPLANTADOS DE ÓRGANO SÓLIDO

El número mundial de casos de LV en receptores de trasplantes de órgano sólido (TOS) se ha cuadruplicado desde la década de 1990 (7). La mayoría de estos casos han ocurrido en la cuenca Mediterránea, particularmente en España, la cual posee una de las mayores reservas de donantes de órganos del mundo.

Durante el brote de leishmaniasis visceral en el área suroeste de Madrid, la incidencia de la enfermedad entre los receptores de trasplantes de órgano sólidos fue del 10,3% (7/68) (8). En 6 de estos 7 pacientes TOS curados de LV, pudimos realizar las pruebas de diagnóstico tradicional y las de inmunología celular de la cartera de servicio del CNM-ISCIII.

Los resultados mostraron que en ninguna muestra de sangre se detectó ADN de *Leishmania* por PCR. Por otro lado, la técnica serológica IFI detectó anticuerpos anti-*Leishmania* en dos de estos pacientes, mientras que la prueba rK39-ICT en solo uno. Las pruebas celulares CPA y WBA dieron un resultado positivo en cinco de los seis sujetos TOS curados de LV, con alta producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  frente a *Leishmania* (9). El único sujeto curado de LV que no mostró respuesta linfoproliferativa por CPA ni citoquinas específicas por WBA, tampoco presentó anticuerpos específicos frente a *Leishmania*. Este sujeto TOS recayó de LV cuatro meses después de realizar esta técnicas y, por lo tanto, no estaba verdaderamente curado y tuvo que ser tratado de nuevo para LV (9).

En resumen, la mayoría de pacientes TOS curados de LV mostraron con una respuesta linfoproliferativa positiva y concentraciones altas de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  tras hacer el ensayo WBA (9). Las mismas respuestas han sido ampliamente reportadas en pacientes inmunocompetentes curados (10,11) e individuos asintomáticos (12,13). Esto demuestra que, a pesar de su inmunosupresión inducida por fármacos, los receptores de trasplante de órgano sólido pueden montar una respuesta Th1

específica contra el parásito. Los presentes resultados confirman la utilidad de los ensayos celulares para el seguimiento de los pacientes TOS tratados por LV, podrían ayudar a confirmar la cura e incluso prevenir las recaídas, ya que, las pruebas celulares realizadas detectaron un paciente TOS que desarrollaría leishmaniasis activa en los meses siguientes.

## MANEJO DE PACIENTES COINFECTADOS CON VIH Y LEISHMANIA

La coinfección VIH/*Leishmania* se ha convertido en un problema emergente en las últimas décadas y se extiende en 35 países endémicos (14), siendo España uno de los países que reporta un mayor número de casos.

La introducción de la terapia TARGA para el tratamiento de la infección por VIH ha resultado en la disminución de los casos de coinfección VIH-LV (15). No obstante, la recurrencia de las recaídas de leishmaniasis en estos pacientes coinfectados, hace necesario el uso de profilaxis secundaria, la cual debe iniciarse al finalizar el tratamiento antiparasitario (16). Sin embargo, en la práctica clínica se ha observado que esta profilaxis no es necesaria en todos los pacientes; además, este tratamiento presenta un alto riesgo de toxicidad para el paciente y conlleva un coste elevado. Por todo lo anterior, sería preferible mantener la profilaxis secundaria sólo en aquellos pacientes que presenten un alto pronóstico de recaída.

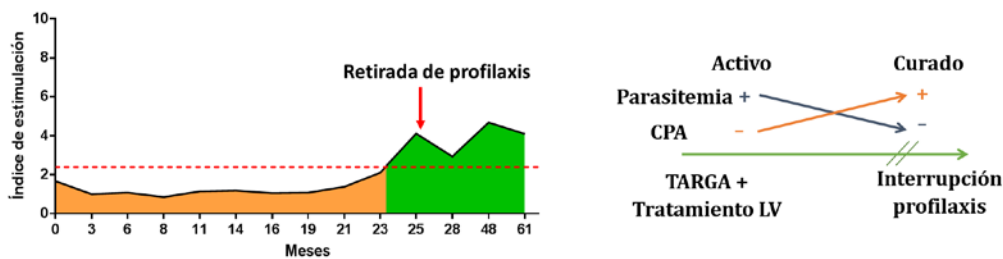
Hasta el momento, se han descrito varios factores asociados al fracaso del tratamiento en pacientes coinfectados VIH-LV: la incapacidad del paciente para aumentar el recuento de células CD4 (>200 CD4/ $\mu$ l), un recuento de células CD4 <100 células/ $\mu$ l y tener antecedentes de recaídas previas. Pero es importante tener en cuenta que la respuesta inmune no solo está relacionada con el número de CD4, sino también con su actividad funcional. Dicha funcionalidad puede ser evaluada con la prueba de proliferación celular CPA y la técnica WBA y detección posterior de citoquinas, ya que un pequeño número de células T de memoria podría ser suficiente para generar una respuesta inmunitaria celular suficiente frente al parásito.

En nuestro estudio utilizamos un resultado positivo de respuesta celular específica a *Leishmania* como criterio para realizar la retirada de la profilaxis antiparasitaria crónica bajo supervisión clínica.

En la figura 3 se muestra, como ejemplo, el seguimiento de uno de los pacientes VIH-LV que desarrolló una respuesta inmunitaria celular específica tras varios años de seguimiento (Figura 3a), a pesar de tener <200 CD4/ $\mu$ l. Esta respuesta positiva conllevó la retirada de la profilaxis secundaria en este paciente, que no ha presentado recaídas clínicas desde entonces hasta el último análisis realizado (más de 4 años).

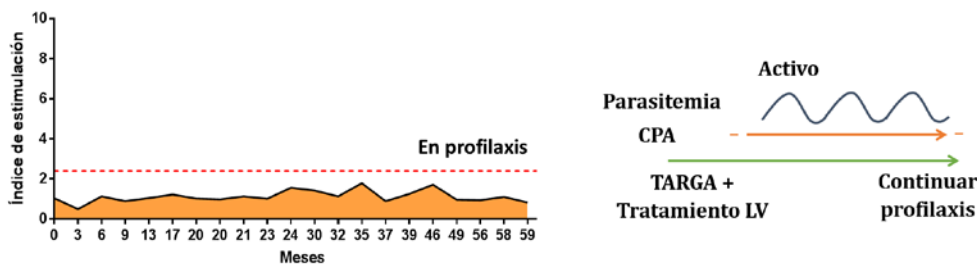
Estos resultados implican la posibilidad real de retirar la profilaxis secundaria en aquellos pacientes VIH-LV que, de forma estable, producen una respuesta celular (Figura 3b) de tipo Th1 frente a *Leishmania*, independientemente del número de células CD4 que tengan.

**Figura 3. Seguimiento realizado a pacientes inmunosuprimidos VIH-LV en terapia TARGA y con profilaxis secundaria para VL. (a) Ejemplo del seguimiento utilizando el ensayo de proliferación celular (CPA).** Se realizó el seguimiento del paciente VIH-LV durante varios años midiendo el índice de estimulación específico respecto al control. La línea roja discontinua indica el punto de corte de la técnica, obtenido tras realizar el mismo ensayo en personas VIH sin leishmaniasis. En verde se muestra cuando la técnica celular fue positiva y en naranja cuando fue negativa. **b) Cuadro resumen para la toma de decisiones para pacientes VIH-LV que respondan a técnicas celulares.**



A continuación se muestra, como ejemplo, uno de los pacientes VIH-LV que no fueron capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria celular tras 5 años de seguimiento (Figura 4a). Este resultado implica la necesidad de la administración de profilaxis secundaria en aquellos pacientes VIH-LV que no generan una respuesta celular frente a *Leishmania* (Figura. 4b).

**Figura 4. Seguimiento realizado a pacientes inmunosuprimidos VIH-LV en terapia TARGA y con profilaxis secundaria para VL. (a) Ejemplo del seguimiento utilizando el ensayo de proliferación celular (CPA).** Se realizó el seguimiento del paciente VIH-LV durante varios años midiendo el índice de estimulación específico respecto al control. La línea roja discontinua indica el punto de corte de la técnica, obtenido tras realizar el mismo ensayo en personas VIH sin leishmaniasis. En naranja se muestra cuando la técnica celular fue negativa. **b) Cuadro resumen para la toma de decisiones para pacientes VIH-LV que no respondan a técnicas celulares.**



En concreto, con esta aproximación, se consiguió retirar la profilaxis secundaria de forma personalizada en el 71% de los pacientes (5/7) de este estudio (6), sin recaídas hasta la fecha (en algunos pacientes 6 años después), mejorando su salud y bienestar. Algunos de estos pacientes tenían un recuento celular  $<200$  CD4/ $\mu$ l, y aun así, fueron capaces de producir una respuesta inmunitaria efectiva frente a *Leishmania*. Basado en los resultados de este pionero estudio, sería aconsejable realizar el seguimiento celular frente a *Leishmania* de los pacientes VIH-LV para comprobar si la profilaxis secundaria ha dejado de ser necesaria para dichos pacientes, incluso en aquellos con un bajo recuento de células CD4. De hecho, esta aproximación ha sido recientemente plasmada en el manual del manejo de casos de leishmaniasis de la región europea de la OMS (17).

## **MANEJO DE PACIENTES CON INMUNOSUPRESIÓN FARMACOLÓGICA INFECTADOS CON LEISHMANIA**

La introducción de estos fármacos inmunosupresores (IS) ha cambiado de manera drástica el curso del tratamiento varias enfermedades autoinmunes crónicas. No obstante, a pesar de su alta efectividad, su uso está claramente relacionado con un mayor riesgo de desarrollo de infecciones causadas por microorganismos (18). Además la inmunosupresión producida por los fármacos IS limita la efectividad del tratamiento antiparasitario, disminuyendo claramente la tasa de cura de los pacientes IS-VL.

Por ese motivo, en la mayoría de estos casos, el fármaco es retirado durante el tratamiento de la leishmaniasis (19,20), lo que permite al paciente IS-VL desarrollar una respuesta celular frente al parásito y alcanzar un tratamiento efectivo. Sin embargo, no hay marcadores ni técnicas que, tras la cura de la LV, permitan determinar el momento de reintroducción del tratamiento inmunosupresor necesario para el tratamiento de la enfermedad autoinmune crónica y el bienestar del paciente.

Este tipo de pacientes inmunosuprimidos IS-VL tienen una respuesta más eficaz al tratamiento de VL respecto a la que presentan los pacientes VIH-VL. No obstante, es necesario monitorizar de forma periódica a estos pacientes inmunosuprimidos a lo largo del tiempo para prevenir recaídas. Es importante destacar además la urgencia de la escritura de guías de manejo clínico para los pacientes IS-VL, ya que en la actualidad no existe ninguna.

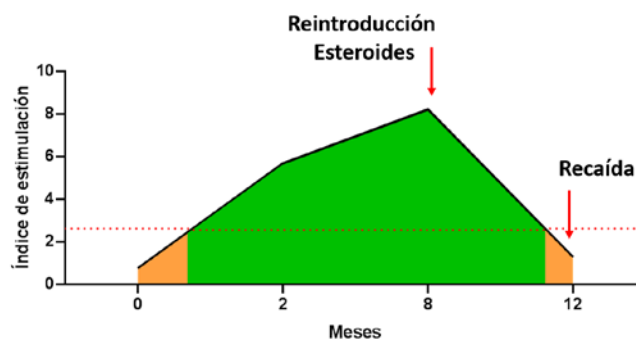
En nuestro estudio hemos considerado un resultado positivo de respuesta celular específica frente a *Leishmania* como criterio para realizar la reintroducción

del tratamiento inmunosupresor de la enfermedad autoinmune, tras el tratamiento antiparasitario frente a la LV.

El seguimiento realizado de la respuesta inmunitaria específica de los pacientes IS-LV dio lugar a diferentes perfiles, algunos de ellos descritos a continuación:

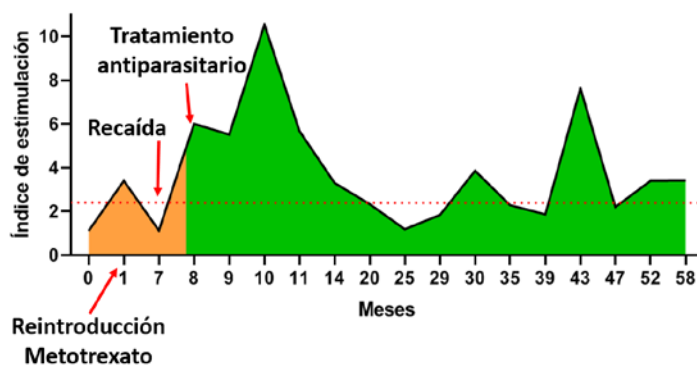
- Nos encontramos con pacientes IS-LV que fueron capaces de generar una respuesta linfoproliferativa CPA de forma rápida (2 meses de seguimiento), [Figura 5](#). Este hecho condujo posteriormente a la administración del inmunosupresor (en este caso esteroides). No obstante, la presencia de este tipo de IS indujo una drástica disminución de dicha respuesta específica, produciéndose una recaída clínica de LV a los pocos meses de su reintroducción. Este tipo de tratamientos producen una inmunosupresión substancial a nivel sistémico y los resultados indican que se debería haber esperado para su reintroducción o hacerlo con el IS a menor dosis.

**Figura 5. Ejemplo del seguimiento utilizando el ensayo de proliferación celular (CPA) de pacientes inmunosuprimidos IS-LV.** Se realizó el seguimiento del paciente IS-LV durante un año midiendo el índice de estimulación específico respecto al control. La línea roja discontinua indica el punto de corte de la técnica, obtenido tras realizar el mismo ensayo en personas en tratamiento IS sin leishmaniasis. En verde se muestra cuando la técnica celular fue positiva y en naranja cuando fue negativa.



- También observamos pacientes IS-LV en los que la necesidad clínica de administrar el tratamiento para su enfermedad autoinmune (en este caso metotrexato) forzó su introducción rápida (al mes del tratamiento de la LV), pese a que la respuesta celular frente a *Leishmania* no se había adquirido aún ([Figura 6](#)). En los meses subsiguientes, se produjo una drástica disminución de dicha respuesta específica, que se tradujo en una recaída de LV a los pocos meses de la reintroducción del IS. Posteriormente se administró de nuevo el tratamiento frente a la LV y finalmente el paciente fue capaz de desarrollar una respuesta inmune celular sin recaídas desde entonces hasta el último análisis realizado (más de 5 años).

**Figura 6. Ejemplo del seguimiento utilizando el ensayo de proliferación celular (CPA) de pacientes inmunosuprimidos IS-LV.** Se realizó el seguimiento del paciente IS-LV durante 5 años midiendo el índice de estimulación específico respecto al control. La línea roja discontinua indica el punto de corte de la técnica, obtenido tras realizar el mismo ensayo en personas en tratamiento IS sin leishmaniasis. En verde se muestra cuando la técnica celular fue positiva y en naranja cuando es negativa.



En concreto, los ensayos de inmunidad celular permitieron establecer el momento para reintroducir el tratamiento inmunosupresor de manera segura en el 80% de los pacientes (12/15), sin recaídas hasta la fecha (hasta 5 años después). Además, se asoció un resultado negativo del test durante el seguimiento con los casos de recaída tras la inmunosupresión. Estos resultados conllevan la necesidad de una vigilancia estrecha de la respuesta celular frente a *Leishmania* de los pacientes IS-LV tras la reintroducción del IS durante un periodo mínimo de 6 meses.

Debido a la combinación de fármacos que toman los pacientes y a las diferentes enfermedades autoinmunes que manifiestan, no encontramos un tratamiento o enfermedad concreta que se pudiera relacionar con el éxito/fracaso en la generación de una respuesta inmune eficaz.

En cambio, en modelos animales hemos observado que algunos tratamientos inmunosupresores, como los inhibidores de la molécula TNF, producen una mayor susceptibilidad a desarrollar una LV severa con respecto a otros, como el metotrexato (21). Es más, estudios recientes de nuestro laboratorio han revelado que algunos inmunosupresores usados en clínica influyen la eficacia del Glucantime® como tratamiento de la LV. Es necesario ahondar en la respuesta celular de los pacientes IS-VL para conocer qué IS es conveniente administrar en casos de LV, con el objetivo de conseguir un tratamiento efectivo y la prevención de recaídas.

## CONCLUSIONES

Las pruebas de inmunología celular CPA y WBA resultaron útiles en la toma de decisiones de pacientes inmunosuprimidos con tratamiento antiparasitario frente a LV para determinar el momento de la cura, evaluar la retirada de la profilaxis secundaria antiparasitaria en pacientes VIH-VL y valorar la reintroducción del tratamiento inmunosupresor en pacientes con inmunosupresión farmacológica IS-VL. Estas pruebas además pueden ayudar a confirmar la cura en pacientes TOS e incluso prevenir las recaídas en pacientes VIH-VL, IS-VL y TOS.

En resumen, se necesitan más estudios que aborden los diferentes problemas específicos de los pacientes inmunosuprimidos con VL, que incluyan la incorporación de las técnicas de inmunología celular CPA y WBA para un seguimiento clínico personalizado y un tratamiento más eficaz de los pacientes, lo cual implicaría un impacto directo en su salud y bienestar.

## REFERENCIAS

1. van Griensven J, Carrillo E, Lopez-Velez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(4):286-99.
2. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):845-58.
3. Ibarra-Meneses AV, Moreno J, Carrillo E. New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2020;36(1):29-38.
4. Aleka Y, Ibarra-Meneses AV, Workineh M, Tajebe F, Kiflie A, Tessema MK, *et al*. Whole Blood Stimulation Assay as a Treatment Outcome Monitoring Tool for VL Patients in Ethiopia: A Pilot Evaluation. *J Immunol Res*. 2020;2020:8385672.
5. Botana L, Ibarra-Meneses AV, Sanchez C, Matia B, San Martin JV, Moreno J, *et al*. Leishmaniasis: A new method for confirming cure and detecting asymptomatic infection in patients receiving immunosuppressive treatment for autoimmune disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(8):e0009662.
6. Castro A, Carrillo E, San Martin JV, Botana L, Molina L, Matia B, *et al*. Lymphoproliferative response after stimulation with soluble leishmania antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients. *Acta tropica*. 2016;164:345-51.

7. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(3):191-9.
8. Carrasco-Anton N, Lopez-Medrano F, Fernandez-Ruiz M, Carrillo E, Moreno J, Garcia-Reyne A, *et al*. Environmental Factors as Key Determinants for Visceral Leishmaniasis in Solid Organ Transplant Recipients, Madrid, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(7):1155-9.
9. Carrillo E, Carrasco-Anton N, Lopez-Medrano F, Salto E, Fernandez L, San Martin JV, *et al*. Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to Leishmania, and for Confirming Cure from Leishmaniasis, in Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10):e0004179.
10. Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, *et al*. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis*. 2005;5:113.
11. Melby PC, Sacks DL. Analysis of the heterogeneity of T-cell responses in human leishmaniasis. *Ann Inst Pasteur Immunol*. 1987;138(5):768-71.
12. de Gouvea Viana L, de Assis TS, Orsini M, da Silva AR, de Souza GF, Caligiorne R, *et al*. Combined diagnostic methods identify a remarkable proportion of asymptomatic *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* carriers who present modulated cytokine profiles. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(6):548-55.
13. Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin Infect Dis*. 2014;58(10):1424-9.
14. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003;97 Suppl 1:3-15.
15. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, *et al*. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(2):334-59, table of contents.
16. Lopez-Velez R, Casado JL, Pintado V. Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2001;7(7):394-5.

17. World Health Organization. Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European region. Gradoni L, Lopez-Velez R, Mokni M, editors: The WHO Regional Office for Europe; 2017.
18. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*. 2006;295(19):2275-85.
19. Venizelos I, Tatsiou Z, Papathomas TG, Orazi A. Visceral leishmaniasis in a rheumatoid arthritis patient treated with methotrexate. *Int J Infect Dis*. 2009;13(4):e169-72.
20. Guedes-Barbosa LS, Pereira da Costa I, Fernandes V, Henrique da Mota LM, de Menezes I, Aaron Scheinberg M. Leishmaniasis during anti-tumor necrosis factor therapy: report of 4 cases and review of the literature (additional 28 cases). *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2013;43(2):152-7.
21. Bernardo L, Solana JC, Romero-Kauss A, Sanchez C, Carrillo E, Moreno J. Effect of immunosuppressants on the parasite load developed in, and immune response to, visceral leishmaniasis: A comparative study in a mouse model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(2):e0009126.

## CAPÍTULO 7

# Caracterización molecular de *Leishmania*

Israel Cruz<sup>1,3</sup>, Carmen Chicharro<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Escuela Nacional de Sanidad, Instituto de Salud Carlos III.

<sup>2</sup> Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>3</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

### LAS HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PERMITEN AMPLIAR EL CONOCIMIENTO SOBRE LOS DIFERENTES COMPONENTES Y DINÁMICAS DEL CICLO DE TRANSMISIÓN DE *LEISHMANIA*

Pero para que sean de mayor utilidad, estas herramientas deben emplearse en el marco de un estudio epidemiológico claramente definido. De lo contrario el tipado de los parásitos resulta menos relevante ([Tabla 1](#)).

**Tabla 1. Algunos usos y utilidades de la biología molecular sobre los agentes implicados en el ciclo de transmisión de *Leishmania*.**

Agente	Uso	Objetivo
<b>Vector</b>	Identificación de especie	Vigilancia epidemiológica
	Estructura de poblaciones al nivel de infra-especie	Determinación de la propagación de vectores
	Detección de <i>Leishmania</i>	Identificación de posibles vectores
	Determinación del origen de la ingesta de sangre	Identificación de posibles reservorios
<b>Parásito</b>	Identificación de especie	Instauración de tratamiento adecuado
	Tipado al nivel de infra-especie	Asociación genotipo-fenotipo Caracterización de brotes
	Estructura de poblaciones al nivel de infra-especie	Determinación de la propagación de vectores Vigilancia epidemiológica
<b>Hospedador</b>	Detección de <i>Leishmania</i> en muestras biológicas	Diagnóstico Identificación de posibles reservorios
	Estudio del genoma del hospedador	Identificación de determinantes genéticos de susceptibilidad/resistencia a la infección

## Investigación molecular en el vector

Los flebótomos son la pieza clave en la transmisión de *Leishmania*, y por tanto en el control de la leishmaniasis. La biología molecular permite determinar tanto la fuente de ingesta de sangre como la presencia de *Leishmania* en estos insectos. El estudio de determinadas regiones del genoma de los flebótomos posibilita la identificación de especies y la caracterización y determinación de distintas poblaciones del vector al nivel de infra-especie.

### Identificación del origen de la fuente de sangre en hembras de flebótomo

Para este proceso se suelen utilizar técnicas de *barcoding*, que generalmente consisten en la amplificación específica y secuenciación de un fragmento de los genes *citocromo b (cytb)* o *citocromo oxidasa I (COI)* de vertebrados. Ambos son genes mitocondriales con una alta significancia filogenética, lo cual posibilita la identificación correcta del animal del cual ha obtenido la sangre el flebótomo (1).

Se ha constatado que algunas especies de flebótomos son oportunistas (sin preferencia entre las distintas especies de vertebrados disponibles para la ingesta de sangre). Por tanto, la identificación de la fuente de sangre puede estar condicionada por el hábitat en que se realicen las capturas. Es por ello importante tener en cuenta este aspecto a la hora de incriminar a una especie animal como reservorio.

### Detección de *Leishmania* en el vector

Las técnicas de detección de ADN de *Leishmania* que se utilizan para la detección del parásito en muestras biológicas humanas o animales son igualmente útiles para detectar la presencia del parásito en el flebótomo. No obstante, para que un resultado positivo sugiera la posibilidad de una relación vector-parásito, es aconsejable que solo se testen las hembras de flebótomo que no muestren presencia de sangre en su abdomen. Ya que los parásitos que han resistido el proceso de digestión y defecación, son los que pueden ser transmitidos (2). Pero la confirmación definitiva de que los parásitos presentes en un flebótomo son potencialmente transmisibles procede de la disección del vector y observación microscópica de los parásitos en la porción anterior de su aparato digestivo, un proceso laborioso, y con alto grado de especialización.

### Identificación de especie de vector

Las claves taxonómicas para flebótomos se basan principalmente en el estudio, tras disección fina, de los filamentos genitales y parte distal del abdomen de los machos

y de las espermatecas y la estructura de las faringes de las hembras. Esto requiere la participación de especialistas en entomología con gran experiencia. Sin embargo, las herramientas moleculares resultan aquí de gran ayuda, al poder aplicarse sobre partes del espécimen, en ambos sexos, y en diferentes estadios de desarrollo del mismo. Se estudian, principalmente, genes mitocondriales del vector como *cytb* y *COI* (3,4). La asignación inequívoca de especie requiere sin embargo secuencias de referencia procedentes de ejemplares identificados correctamente mediante aproximaciones taxonómicas aceptadas.

### Investigación molecular en el parásito

Las herramientas moleculares permiten determinar el polimorfismo genético del parásito facilitan la identificación de especies de *Leishmania* y el sub-tipado de las mismas. Al combinar con herramientas de filogenia y genética de poblaciones se puede contribuir a la resolución de problemas epidemiológicos. Y también se pueden estudiar el genoma del parásito, determinados grupos de genes o su expresión para obtener información sobre la virulencia o la resistencia a fármacos.

### Identificación de especie y variabilidad intra-específica

En ocasiones la identificación de especie es clave para establecer el pronóstico de la infección y el tratamiento más adecuado. Cuando distintas especies de *Leishmania* son co-endémicas, su identificación es fundamental para comprender los distintos ciclos de transmisión y establecer medidas de control adecuadas. Son varias las regiones del genoma de *Leishmania* estudiadas para este propósito, desde los mini-círculos del ADN mitocondrial hasta genes y regiones no codificantes del ADN nuclear. Actualmente se considera que la secuenciación de un fragmento interno de aproximadamente 1400 pares de bases del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 KDa (*HSP70*) de *Leishmania* proporciona la mejor información para el diagnóstico de especie. El estudio de la secuencia de los espaciadores transcritos internos (ITS) 1 y 2 es especialmente útil en la caracterización de las especies de *Leishmania* del hemisferio oriental) (5,6).

### Genética de poblaciones del parásito

La aplicación de las herramientas moleculares en estudios epidemiológicos relacionados con la leishmaniasis se basa en la definición un gran número de marcadores moleculares diferenciales entre especímenes de *Leishmania* tanto a nivel de especie como de infra-especie. En general, el tipo de marcador a elegir depende de la pregunta a responder en el contexto de una investigación epidemiológica. El análisis

de los datos generados por la mayoría de herramientas moleculares con aplicación en epidemiología se llevará a cabo mediante dos aproximaciones principales: genética de poblaciones o filogenia. El análisis de genética de poblaciones permite obtener una «fotografía instantánea» de la variabilidad genética dentro de una misma población y entre poblaciones distintas, mientras que el análisis filogenético se centra en la «historia» y relaciones evolutivas de las poblaciones, por empleo de marcadores neutrales no afectados por los mecanismos de selección natural.

En ocasiones, el uso de marcadores no-neutrales permite definir factores específicos de cada cepa, como factores de virulencia o atributos relacionados con una mayor capacidad de transmisión.

### Marcadores moleculares virulencia y resistencia a fármacos

La patogenicidad de la infección por *Leishmania* viene determinada por distintos factores, entre otros:

- a. el componente genético del parásito,
- b. la susceptibilidad genética del hospedador
- c. la respuesta inmune que este arme contra el parásito.

En términos generales *Leishmania* presentará dos tipos de determinantes moleculares de patogenicidad: proteínas de superficie y enzimas asociadas al metabolismo implicado en la evasión de la respuesta inmune (Tabla 2).

**Tabla 2. Algunas de las proteínas implicadas en la patogenicidad de *Leishmania* (7-10).**

Proteína	Actividad
<i>gp63</i> - metaloproteasa principal de la superficie del parásito	Esencial en el inicio y mantenimiento de la infección
<i>cpb</i> - cisteín proteasa-b	Participa en los procesos de invasión, supervivencia y evasión
<i>HASPB/K26</i> - proteína de superficie acilada hidrofílica B	Es capaz de sobre-estimular la producción de linfocitos B, desviando así la respuesta inmune celular en favor del parásito
<i>A2</i> - proteína de superficie del amastigote	Está implicada en la supervivencia en el interior del macrófago

La comprensión de los mecanismos biológicos asociados a la resistencia a fármacos es importante de cara a evaluar su impacto en la eficacia de distintas opciones terapéuticas, así como en los diversos programas de control. Durante mucho tiempo los antimoniales pentavalentes (SbV) han sido el tratamiento de primera

línea contra la leishmaniasis. Sin embargo, en el Subcontinente Indio, región que históricamente acumuló la mayoría de casos de leishmaniasis visceral, se ha venido registrando en los últimos años una tasa cada vez mayor de fallo terapéutico, relacionada con la resistencia de *Leishmania* a los SbV. Esto ha animado la búsqueda, a menudo infructuosa, de marcadores moleculares que permitan determinar el perfil de resistencia al fármaco en los parásitos. En esta línea, el análisis del genoma completo de *Leishmania* ha permitido determinar una serie de polimorfismos de único nucleótido (SNPs) que pudieran estar relacionados con la falta de respuesta a los SbV (11). Actualmente se considera que el mecanismo mediante el cual *L. donovani* presenta resistencia a los SbV está asociado a una mayor capacidad de adaptación de las cepas que han sido sometidas a presión con estos fármacos, debido a que poseen la capacidad de activar mecanismos efectores en la célula que hospeda al parásito, ejerciendo así una presión que favorece la selección de cepas con mayor capacidad de adaptación. Esto explicaría por qué las cepas de *L. donovani* resistentes a los SbV son todavía muy prevalentes en Bihar (India) a pesar de que se haya reducido la presión con este fármaco desde que se comenzaron a emplear otras opciones terapéuticas (12). En el caso de *L. infantum* se ha comprobado que, en cepas aisladas en la región occidental de Mediterráneo, la resistencia a los SbV podría estar asociada a la amplificación o sobreexpresión de ciertos genes (13).

En los últimos años, los estudios del genoma completo de *Leishmania* están mostrando que las variaciones intra-específicas a nivel de cromosomas y genes influirían en las diferencias en tropismo, así como en la respuesta al tratamiento (14). El estudio detallado del genoma de *Leishmania* revela cómo este parásito se adapta a los cambios ambientales. Para ello, podría combinar la selección de alelos con el mantenimiento de una alta diversidad genética. Procesos que en teoría deberían ser mutuamente excluyentes, ya que se esperaría que un parásito bajo una fuerte selección (ej. presión farmacológica) pierda rápidamente su diversidad genética. Sin embargo, en *Leishmania*, las duplicaciones cromosómicas muy frecuentes hacen posible combinar ambos procesos. Esta perspectiva sobre la inestabilidad genómica en *Leishmania* abre nuevas avenidas para el estudio de los mecanismos de resistencia a fármacos y el descubrimiento de biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico (15).

## **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PARÁSITOS IMPLICADOS EN EL BROTE**

Entre las actividades de apoyo al estudio del brote de leishmaniasis, el Centro Colaborador de la OMS del Instituto de Salud Carlos III (WHO-CCL), realizó el tipado molecular de un conjunto de 73 aislados del área del brote y otras regio-

nes de Madrid obtenidos desde enero de 2008, el año anterior al inicio del brote, hasta julio de 2012. Y se estudió, además, un conjunto de 83 aislados humanos de *L. infantum*, obtenidos en Madrid entre 1988 y 2005, que habían sido tipados previamente, mediante electroforesis de enzimas de múltiples loci, como MON-1 y MON-24, zimodemas responsables de la mayoría de los casos de leishmaniasis cutánea y visceral en España (16).

Este trabajo dio lugar al estudio de tipificación molecular más completo realizado en España con aislados obtenidos en un período tan corto (2008-2012) y en una pequeña área geográfica. También proporcionó información adicional sobre 83 aislados humanos de *L. infantum* MON-1 y MON-24 obtenidos en Madrid entre 1988 y 2005. Otra información de tipado molecular en contextos similares era escasa hasta la fecha.

Un estudio previo que incluyó aislados de *L. infantum* de Madrid y otras regiones de España (aislados entre 1986 y 1993), informó solo sobre la presencia de los genotipos ITS A y B para esta especie de *Leishmania* (17). Sin embargo, en el brote de Madrid, el 71% (52/73) de los aislados de *L. infantum* del primer conjunto tenían un tipo ITS que se denominó ITS-LOMBARDI, el cual no se había descrito previamente. Este genotipo ITS también estaba presente en todos los aislados de *L. infantum* MON-24 y en el 20% (11/55) de los aislados de *L. infantum* MON-1 del segundo conjunto. Un hallazgo interesante fue el descubrimiento del genotipo ITS-LOMBARDI en la cepa MHOM/ES/87/Lombardi de *L. infantum* zimodema MON-24. Esta cepa había sido aislada en España (sin mayor información sobre su origen) en 1987, aunque no se publicó en su momento ningún informe sobre este tipo ITS, solo poniéndose esto de manifiesto durante la investigación realizada por el WHO-CCL, quienes designan LOMBARDI a este genotipo tras constatar que este sería el aislado más antiguo identificable con este perfil ITS.

El análisis filogenético de los distintos genotipos ITS del complejo *L. donovani*, al cual pertenece *L. infantum*, reveló que los aislados con genotipo ITS-LOMBARDI no forman un grupo filogenético claro con otros genotipos ITS (ITS A, B), descritos con anterioridad en la cuenca mediterránea, Brasil o China. El estudio de tipado molecular concluyó que ITS-LOMBARDI ha estado circulando en España con anterioridad al brote. A su vez, ITS-LOMBARDI es frecuente en los aislados de *L. infantum* de Madrid y circulando en esta región desde al menos 1992. Este genotipo ITS también es el único observado en aislados de todos los casos humanos asociados al brote de la Comunidad de Madrid.

Un segundo estudio de tipado molecular dirigido al gen *haspb* (*k26*) incluyó aislados españoles de *L. infantum* y reveló tamaños para este gen de aproximadamente 626 pares de bases (pb), 870/980 pb, 870/1200 pb y 870/1300 pb (9). En

el estudio que realizó el WHO-CCL en el marco del brote, se encontraron tamaños del gen *k26* de entre 584 y 962 pb, siendo los de 626 y 920 pb los más frecuentes, aunque entre los casos asociados al brote solo se encontraron tamaños de 836-962 pb para este gen, siendo el de 920 pb el más frecuente.

El contexto epidemiológico del brote de leishmaniasis que afecta a las Áreas de Salud 9 y 10 era consistente con la transmisión focal del parásito. Esto, junto con el hecho de que los aislados de *L. infantum* obtenidos de pacientes en estas áreas presentaron principalmente el genotipo combinado ITS-LOMBARDI / *k26*-920, podría sugerir que una cepa emergente, o menos común, de *L. infantum* fue el agente causal. Pero esto no puede concluirse con certeza, ya que la información previa en cuanto a tipado molecular era muy escasa. El genotipo ITS-LOMBARDI / *k26*-920 se aisló también en casos de leishmaniasis de cinco de las once Áreas de Salud de Madrid, estando presente en dos de ellas desde al menos 2008.

Además, los análisis del gen *k26* indicaron que el brote no fue causado por una sola cepa del parásito (se llegaron a encontrar cuatro genotipos diferentes combinados ITS/*k26*).

## CONCLUSIÓN

La caracterización molecular de este brote de leishmaniasis supuso una gran oportunidad para validar algunos de los marcadores moleculares relevantes en aquella época. No obstante, la falta de datos previos, generados con los mismos marcadores, hizo difícil conocer con precisión la historia natural de las cepas de *L. infantum* causantes del brote. De cualquier modo, el grado de heterogeneidad de los aislados en el área del brote indica que probablemente lo que ocurrió es que un ciclo de transmisión ya establecido, con su propio grado de diversidad del parásito, se propagase a un área en la que el contexto ecológico facilitó una transmisión intensa en una población con baja inmunidad previa a *Leishmania*.

Dado que la leishmaniasis se considera una enfermedad emergente y en propagación en nuestro medio, se hace necesario potenciar las actividades dirigidas a unir la investigación en genómica con la vigilancia. Y de este modo contribuir a una mejor comprensión de la epidemiología de la leishmaniasis y el desarrollo de estrategias de control.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alcaide M, Rico C, Ruiz S, Soriguer R, Muñoz J, Figuerola J. Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method

- to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. PLoS One. 2009;4:e7092.
2. Sadlova J, Dvorak V, Seblova V, Warburg A, Votypka J, Volf P. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. Parasit. Vectors. 2013;6:186.
  3. Lewis DJ. Phlebotomid sand flies (Diptera: Psychodidae) of the oriental region. Bulletin of World Health Organization. 1978;37:1-343.
  4. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. Biol. Sci. 2003;270:313-21.
  5. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infect. Genet. Evol. 2010;10:238-45.
  6. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2003;47:349-58.
  7. Olivier M, Hassani K. Protease inhibitors as prophylaxis against leishmaniasis: new hope from the major surface protease gp63. Future Med. Chem. 2010;2:539-42.
  8. Hide M, Bras-Gonçalves R, Bañuls AL. Specific cpb copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. Parasitology. 2007;134:379-89.
  9. Haralambous C, Antoniou M, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K. Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum zymodemes*: a useful tool for typing MON-1. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2008;60:33-42.
  10. Oliveira TM, de Vasconcelos EJ, Nakaghi AC, Defina TP, Jusi MM, Baldani CD, Cruz AK, Machado RZ. A novel A2 allele found in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2011;20:42-8.
  11. Vanaerschot M, Decuyper S, Downing T, Imamura H, Stark O, De Doncker S, Roy S, Ostyn B, Maes L, Khanal B, Boelaert M, Schönian G, Berriman M, Chappuis F, Dujardin JC, Sundar S, Rijal S. Genetic markers for SSG resistance in *Leishmania donovani* and SSG treatment failure in visceral leishmaniasis patients of the Indian subcontinent. J. Infect. Dis. 2012;206:752-5.

12. Vanaerschot M, Decuypere S, Berg M, Roy S, Dujardin JC. Drug-resistant microorganisms with a higher fitness--can medicines boost pathogens? *Crit. Rev. Microbiol.* 2013;39:384-94.
13. 45 Jeddi F, Mary C, Aoun K, Harrat Z, Bouratbine A, Faraut F, Benikhlef R, Pomares C, Pratlong F, Marty P, Piarroux R. Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-resistant field isolates of *leishmania* species from the Western mediterranean area. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58:4866-74.
14. Samarasinghe SR, Samaranayake N, Kariyawasam UL, Siriwardana YD, Imamura H, Karunaweera ND. Genomic insights into virulence mechanisms of *Leishmania donovani*: evidence from an atypical strain. *BMC Genomics.* 2018 Nov 28;19(1):843.
15. Prieto Barja P, Pescher P, Bussotti G, Dumetz F, Imamura H, Kedra D, Domagalska M, Chaumeau V, Himmelbauer H, Pages M, Sterkers Y, Dujardin JC, Notredame C, Späth GF. Haplotype selection as an adaptive mechanism in the protozoan pathogen *Leishmania donovani*. *Nat Ecol Evol.* 2017 Dec;1(12):1961-1969.
16. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013 Jul 25;18(30):20545.
17. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 2005;7(11-12):1224-34.

## CAPÍTULO 8

# Reservorios de la Leishmaniasis: nuestra experiencia en la Comunidad de Madrid

Carmen Chicharro<sup>1,2</sup>, Silvia Migueláñez<sup>1</sup>, Emilia García<sup>1</sup>, Fernando Fuster<sup>3</sup>,  
Maria Flores<sup>1,4</sup>, Javier Nieto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Leishmaniasis y enfermedad de Chagas, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

<sup>3</sup> Área de Vigilancia de Riesgos Ambientales en Salud, SG de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental. DG de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

<sup>4</sup> Fundación Mundo Sano, España.

En el sur de Europa, la leishmaniasis tuvo inicialmente un carácter rural, aunque actualmente se está convirtiendo en urbana y periurbana, por distintas razones entre las que habría que destacar los cambios climáticos, económicos y demográficos haciendo de la leishmaniasis una enfermedad emergente o reemergente (1). La infección ocasionada por *Leishmania* está determinada por una serie de factores que permiten el contacto íntimo de los parásitos con los flebótomos y con los diferentes hospedadores vertebrados, llevando a cabo el desarrollo completo y continuo de su ciclo biológico.

Las leishmaniasis, son un grupo de enfermedades causadas por más de 20 especies pertenecientes al género *Leishmania*, que están incluidas entre las enfermedades tropicales desatendidas. La mayoría de los humanos y animales que se infectan no desarrollan síntomas. La forma clínica de presentación de la enfermedad se debe fundamentalmente a la especie del parásito y a la situación del sistema inmune del hospedador y fundamentalmente son cutánea, mucocutánea y visceral, aunque en los animales tanto domésticos como silvestres se suelen presentar las formas cutáneas y/o viscerales. Se transmite por flebótomos (orden *Diptera*, familia *Psychodidae*), tiene una distribución mundial y es endémica en más de 90 países (2).

Todas las especies del género siguen un ciclo biológico con el mismo patrón, alternando formas amastigotes que se replican intracelularmente en el huésped vertebrado, y formas promastigotes que se reproducen en el sistema digestivo del insecto vector. Los flebotomos (géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*) se infectan en el momento que las hembras se alimentan de un reservorio parasitado.

Para la prevención y control de la enfermedad se requiere una combinación de estrategias, que incluyen el diagnóstico temprano y el tratamiento rápido y eficaz, el control de vectores, la vigilancia eficaz de la enfermedad, el control de los reservorios animales tanto domésticos como silvestres y la toma de medidas de Salud Pública por parte de las diferentes administraciones implicadas (3).

Los animales domésticos han sido ampliamente estudiados y, tradicionalmente, los perros se consideran el principal reservorio animal, pero en varios estudios se han encontrado también gatos y otras especies animales infectados con el parásito (4). Sin embargo, se encontró que los perros tenían una prevalencia similar o incluso menor que los animales silvestres en algún brote en humanos, probablemente debido a las medidas preventivas aplicadas sobre los perros (5,6). Por estas razones, la investigación del papel de los animales silvestres en la infectividad y la posible transmisión del parásito a los humanos es un paso importante para controlar futuros brotes y controlar la endemidad de la enfermedad en ciertas áreas. La coincidencia en el tiempo y en el espacio de cambios en los factores que influyen en la población de vectores (por ejemplo, deforestación, cambio climático y nuevas áreas urbanizadas), y la presencia de potenciales reservorios animales, diferentes a los cánidos, son factores esenciales en la aparición de brotes.

Según la OMS (1), el término «reservorio» debe emplearse sólo para animales que sean lo suficientemente abundantes y longevos como para que sirvan de fuente de alimentación para los vectores y que mantengan un contacto íntimo con ellos. Además de representar una proporción importante de la biomasa de mamíferos. Para considerar un animal como reservorio tienen que coincidir varias características:

- a. Que haya un porcentaje alto de animales y muestras infectadas
- b. Que el curso de la infección en esos animales sea largo.
- c. Que los parásitos estén presentes en la piel y/o en la sangre de estos animales con una carga parasitaria lo suficientemente alta para que los vectores se infecten
- d. Que los parásitos aislados de las diferentes muestras de los reservorios, de los vectores y de los humanos sean iguales. (7).

Roque y Jansen (8) emplearon los términos *huéspedes de mantenimiento* para aquellos animales mamíferos que pueden infectarse y mantener la infección y *huéspedes amplificadores* para los mamíferos que, además de mantener la infección, pueden favorecer la transmisión, que suelen coincidir con aquellos que tienen cargas parasitarias más altas en la sangre y en la piel. La gran mayoría de los animales silvestres se podrían considerar como huéspedes de mantenimiento, mientras que sólo unos pocos podrían considerarse huéspedes amplificadores.

El perro cumple con todos los requisitos para ser considerado el reservorio principal de la leishmaniasis causada por *L. infantum*. En los perros, normalmente, esta infección se manifiesta de forma subclínica crónica, sólo una pequeña proporción de animales desarrollan síntomas de la enfermedad (9), permaneciendo la mayoría asintomáticos. La seroprevalencia canina en la cuenca mediterránea varía entre un 5-30% dependiendo de la región (10). Sin embargo, cuando se utiliza la PCR para determinar la infección se encuentran tasas más altas, llegando a tasas del 70 al 80% en algunos de los focos (11). El aumento de la incidencia de leishmaniasis por *L. infantum*, sugiere que las medidas de control existentes no son muy eficaces (12) y que pueden existir otros reservorios que no se han considerado hasta ahora.

Desde hace más de 30 años se han realizado múltiples estudios en zonas endémicas para investigar la infección por *Leishmania* en gatos. La mayor parte de estas infecciones son causados por *L. infantum* y se han diagnosticado en países de la Cuenca Mediterránea, como Italia, España, Portugal, Francia, Grecia, Turquía, Chipre (13). Sin embargo, se detectó ADN de *L. major* en gatos de Turquía y Lisboa (Portugal) y de *Leishmania tropica* de Turquía (14,15,16).

Las cepas de *L. infantum* detectados en gatos comparten los mismos patrones que las aisladas de humanos, perros y flebotomos (16,17). Los estudios que se han realizado son extremadamente heterogéneos según las características de la población analizada, las técnicas y metodologías utilizadas, etc... Pero todos sugieren que los gatos están frecuentemente expuestos a la infección por el parásito, de forma similar a lo que ocurre con los perros. Los gatos sanos con PCR positiva pueden ser negativos para las técnicas serológicas (13,18). La duración de la infección se ha comprobado que puede ser larga, se han estudiado fuera de la temporada de transmisión. Sin embargo, cuando se compara la prevalencia o la incidencia anual en poblaciones de perros y gatos en zonas endémicas se ha comprobado que son más bajas (19,20). La población felina sigue siendo, junto con los perros, el grupo más importante afectado por la leishmaniosis. Se sabe que las infecciones felinas suelen ser crónicas.

Existe una gran diversidad de especies de animales silvestres que se han identificado como posibles reservorios de *Leishmania*. Estos animales pueden actuar como hospedadores y contribuir a la persistencia y transmisión de la enfermedad

en la naturaleza. Entre ellos podíamos destacar roedores, marsupiales, murciélagos y otros mamíferos pequeños. La identificación de estos reservorios es fundamental para comprender y controlar la epidemiología de la enfermedad.

La clínica en estos animales puede variar desde la no aparición de síntomas, aparición de lesiones cutáneas hasta enfermedades sistémicas graves que pueden ocasionar la muerte. Además, la infección puede afectar la capacidad reproductiva de los animales, lo que tiene implicaciones importantes para la conservación de especies en peligro de extinción. Las muestras biológicas que más se han empleado en los distintos trabajos publicados, para estudiar la presencia de los parásitos en los animales silvestres han sido la sangre y la piel. Por un lado, debido a la facilidad de su extracción y por otro porque son estas las zonas más accesibles a los vectores. Sin embargo, cuando se analizan otras muestras como el bazo, el hígado, ganglio linfático o la médula ósea, la prevalencia aumenta, ya que el parásito tiende a acantonarse en estos tejidos (6).

Las técnicas utilizadas para demostrar la presencia del parásito en estas especies han sido muy variadas. En el pasado se probaron en roedores y otros animales silvestres el diagnóstico directo del parásito, en biopsias o improntas de piel u otros órganos, o mediante el cultivo en medios específicos (8). De hecho, todavía se utilizan en algunos estudios hoy en día, aunque con menos frecuencia (22,23,24,25). La detección de anticuerpos específicos frente a *Leishmania* mediante diferentes técnicas serológicas (IFI, ELISAs, inmunocromatografía, DAT, etc.) se ha utilizado ampliamente en animales domésticos y también, aunque en menor medida, en animales silvestres, para evidenciar de forma indirecta la infección por *Leishmania* (22,26,27). La serología se ha utilizado mucho en los estudios con carnívoros silvestres (28). El xenodiagnóstico se ha utilizado rara vez, para demostrar la posible transmisión de la infección en animales silvestres, demostrando así el carácter de reservorio de los estos hospedadores (29,30).

Todas estas técnicas, aunque generalmente son menos sensibles, se utilizaron ampliamente para diagnosticar y estudiar la infección por *Leishmania* en animales silvestres antes de la introducción de la amplificación del ADN mediante PCR en el diagnóstico de esta infección, la utilización de las técnicas moleculares ha aumentado considerablemente la sensibilidad en la detección del parásito. Desde que la PCR se convirtió en una técnica rutinaria para detectar *Leishmania* en las diferentes muestras biológicas, la lista de animales silvestres infectados se ha ampliado. La detección Detecta ADN (presencia e identificación del parásito) es sensible, específica, rápida, e independiente de la carga parasitaria y de factores subjetivos. Se puede realizar en todo tipo de muestras biológicas, aunque puede haber resultados contradictorios dependiendo de la muestra que se utilice, debido a la diferente respuesta inmune local

y a la distribución heterogénea en los diferentes tejidos. Existe una gran variedad de técnicas moleculares que nos permiten detectar, identificar o cuantificar al parásito dependiendo los tipos de PCR que se utilicen (PCR convencional, *Nested* PCR o RT-PCR). PCR es el *gold estándar* del diagnóstico molecular. En la literatura se puede encontrar un gran número de primers, métodos y objetivos para la detección por PCR (31), La sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas moleculares depende de los primers, de las dianas a la que va dirigida (SSuRNA, kDNA ITS-1 y2, Hsp70, etc.), del número de copias de las dianas.

La utilización de la serología y de otras técnicas diagnóstica tiene una serie de limitaciones, como puede ser en los casos que el título de anticuerpos sea bajo, o la baja sensibilidad de las técnicas empleadas, en el caso de hospedadores asintomáticos y por supuesto en el seguimiento de tratamiento, en el caso de tratar a esto animales. Para estas situaciones las técnicas moleculares son una alternativa muy eficaz a las otras técnicas diagnósticas convencionales empleadas hasta ese momento. Presentan una mayor sensibilidad y especificidad y pueden analizar muchas muestras a la vez.

Brandao-Filho *et al.* (22) compararon tres pruebas de diagnóstico con muestras de bazo de 203 animales silvestres de diferentes especies y encontraron que la PCR de kADN es tres veces más sensible (17,6%) que los métodos tradicionales como la microscopía de improntas (5,7%) o el cultivo (1,3%). La serología es menos sensible que las técnicas moleculares, como se demostró para la prevalencia de *Leishmania* en otros animales silvestres (8,1% por serología frente a 20% por PCR) (32). En otros estudios, realizados en pequeños mamíferos se encontraron resultados similares (5% por serología frente a 23,2% por PCR) (33).

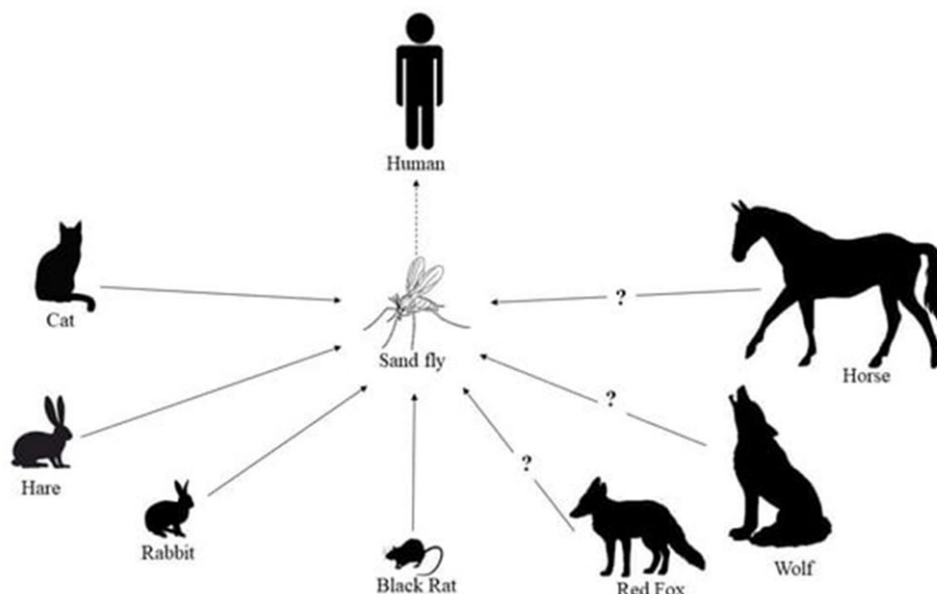
*L. infantum* es la especie zoonótica de *Leishmania* con una mayor distribución global, está presente en todos los continentes. Sin embargo hay descrito en la literatura infecciones en Latinoamérica por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, en multitud de especies: roedores, perezosos, osos hormigueros, primates y diferentes carnívoros silvestres. Así como infecciones por *L. amazonensis* en Centro y Sudamérica, en zorrillos, en varias especies de murciélagos, en primates, zarigüeyas y roedores. También se han encontrado en múltiples especies de animales salvajes infectados con *L. mexicana* que pueden presentar lesiones concordantes con leishmaniasis cutánea. De igual forma, se han aislado de diferentes especies de roedores, *L. tropica* y *L. major* en distintas zonas del cercano y medio oriente. En la literatura hay una gran cantidad de trabajos en los que se describe la presencia de *L. infantum* en diferentes especies de varios órdenes de mamíferos en diversas partes del mundo. Estos aislamientos se producen tanto en animales silvestres en la naturaleza como en animales en cautividad en parques zoológicos (8,34,58).

Cardoso *et al.* y Azami-Conesa *et al.* (35,58) hacen una exhaustiva revisión de los animales en los que se ha aislado el parásito, de la que se hace un resumen en la [Tabla 1](#).

**Tabla 1. Animales infectados por *Leishmania* sp.**

Familia	Especies
Cánido	Chacal Dorado ( <i>Canis aureus</i> ) Lobo gris ( <i>Canis lupus</i> ) Zorro Rojo ( <i>Vulpes vulpes</i> )
Felidae	Gato Montés Europeo ( <i>Felis silvestris</i> ) Lince Ibérico ( <i>Lynx pardinus</i> ) León de Berbería ( <i>Panthera leo</i> ) Tigre ( <i>Panthera tigris</i> )
Herpestidae	Mangosta egipcia ( <i>Herpestes ichneumon</i> )
Mustélidae	Nutria euroasiática ( <i>Lutra lutra</i> ) Marta de haya ( <i>Martes foina</i> ) Marta de pino europea ( <i>Martes martes</i> ) Tejón europeo ( <i>Meles meles</i> ) Visón europeo ( <i>Mustela lutreola</i> ) Turón ( <i>Mustela putorius</i> ) Hurón domesticado ( <i>Musela putorius Furo</i> ) Armiño ( <i>Mustela erminea</i> ) Comadreja ( <i>Mustela nivalis</i> ) Visón americano ( <i>Neovison vison</i> )
Fócidae	Foca monjeo ( <i>Monachus monachus</i> )
Miniopteridae	Murciélago común ( <i>Miniopterus schreibersii</i> )
Macropodidae	Ualabí de Bennett ( <i>Macropus rufogriseus</i> )
Erinaceidae	Erizo europeo ( <i>Erinaceus europaeus</i> )
Soricidae	Musaraña ( <i>Crocidura russula</i> ) Musaraña etrusca ( <i>Suncus etruscus</i> )
Équidos	Caballo ( <i>Equus ferus</i> Caballus) Burro ( <i>Equus africanus</i> Asinus)
Homínidos	Orangután ( <i>Pongo pygmaeus</i> Pygmaeus)
Muridae	Ratón de Madera ( <i>Apodemus sylvaticus</i> ) Ratón doméstico ( <i>Mus musculus</i> ) Ratón argelino ( <i>Mus spretus</i> ) Rata Marrón ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Rata Negra ( <i>Rattus rattus</i> )
Sciuridae	Ardilla roja euroasiática ( <i>Sciurus vulgaris</i> )

**Figura 1. Animales diferentes a los perros, probados o sospechosos (?) que pueden ser considerados reservorios de *Leishmania infantum* para *Phlebotomus* spp. y los humanos en Europa. Tomado de Cardoso *et al.* 2021 (35).**



Mención especial merecen las especies de la familia Leporidae; Liebre europea (*Lepus europaeus*), Liebre Ibérica (*Lepus granatensis*), Conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), pues son las que han originado brotes humanos. En Europa se han identificado liebres positivas a *Leishmania* en diferentes regiones geográficas (Grecia, Italia y España) y utilizando diferentes técnicas diagnósticas (Serología y PCR) con distintas incidencias desde 65 % hasta el 10 % dependiendo de la técnica empleada y de la región geográfica. La mayoría de los animales estudiados eran asintomáticos. Además, la similitud detectada entre las secuencias de ADN de los parásitos aislados de liebres y perros podría ser indicativa de una posible superposición de los ciclos de transmisión silvestre y doméstica de *Leishmania* spp. en Grecia (36).

En julio de 2009, se describió un brote de leishmaniasis humana en el suroeste de la Comunidad de Madrid (CM), en una zona cercana a un parque periurbano (Bosquesur), donde se comprobó que había una gran población de liebres. El agente causal fue identificado como *L. infantum* y se encontraron altas densidades de *P. perniciosus*. No hubo un aumento de la seroprevalencia canina (37) y los estudios entomológicos determinaron que había una relación importante entre el vector, las liebres y la población humana infectada en el foco. Esta es la primera evidencia de que las liebres pueden desempeñar un papel como reservorio en Europa. La caracterización molecular de los aislados obtenidos de flebotomos infectados, de las liebres infectadas y de los casos humanos eran todos *L. infantum* ITS tipo Lombardi (38).

En España se han identificado conejos infectados con *L. infantum* en varias regiones, En la provincia de Granada se comprobó que el 21% de los animales estudiados fueron positivos después de analizar diferentes muestras (sangre, médula ósea, hígado, bazo, corazón y piel), aunque ninguno de ellos presentó síntomas relacionados con la enfermedad. Se analizaron mediante técnicas parasitológicas, serológicas y/o moleculares. En el área del brote de Fuenlabrada se comprobó que los flebotomos se infectaban sobre los conejos positivos, pero en un porcentaje más bajo que las liebres, aunque se demostró que la infección crónica es duradera durante el período de no transmisión, como ocurre con las liebres (29). El análisis por PCR de muestras de piel detectó 12 (17,4%) muestras positivas, mientras que el ADN de *Leishmania* solo se encontró en dos (2,9%) muestras de bazo. No aparecieron animales con síntomas. En otras regiones de España se han detectado la presencia de conejos infectados por *L. infantum*. En la región de Murcia, se detectaron un 30,0% de conejos positivo por PCR. Comprobando que había más probabilidades de ser positivo en la piel que en otros órganos. (39). Sin embargo, otro estudio en una zona cercana determinó un 58,8% de conejos positivos silvestres y se comprobó la semejanza de las cepas que circulaban en esa zona entre conejos, perros y humanos (40).

En el suroeste de CM, el número de los nuevos casos de leishmaniasis humana aumentó desde 2010. Su incidencia creció de 3 casos por 100 000 habitantes en 2009 a 55,7 en 2011. Al comienzo del brote no se encontró un factor epidemiológico clásico que explicara esta situación. El único dato relevante que se obtuvo mediante los análisis epidemiológicos de este brote fue que la población afectada residía en las proximidades de un nuevo parque, en el que se comprobó, en ese momento, que la población de liebres y conejos era muy elevada. Con estos antecedentes, se inició un estudio para determinar la implicación de otros reservorios, diferentes al perro, que estarían participando en la transmisión de la enfermedad en este brote, concretamente estudiamos la presencia de *Leishmania* en liebres, conejos y gatos.

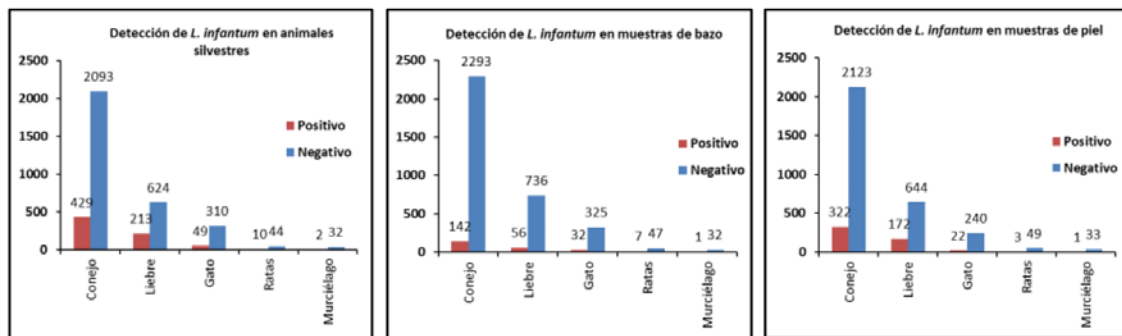
El estudio que nosotros realizamos sobre los animales silvestres relacionados con el brote de leishmaniasis de la CM (Fuenlabrada) y sus alrededores se hizo con animales capturados por la Dirección General de Medio Ambiente o Dirección General de Ordenación e Inspección de la Consejería de Sanidad de la CM, y remitidos a VISAVET, donde se extrajeron las muestras de bazo y piel. Estas muestras fueron recogidas en 250 µl de NET 10 (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM) y conservadas a -20 °C hasta su envío a la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, Centro Colaborador de la OMS para la leishmaniasis, del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III para su posterior análisis. Desde el año 2011 hasta el año 2022 se procesaron un total de 7280 muestras (bazo, n=3671;

y piel, n=3609), obtenidas de 3806 animales (conejos, n=2522; liebres, n=837; gatos, n=359; ratas, n=54; murciélagos, n=34).

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit comercial QIAamp DNA mini Blood Mini kit (QIAGEN®), siguiendo las instrucciones del protocolo recomendado para tejidos. El ADN se eluyó en 200 µl de agua destilada estéril y se conservó a 4 °C hasta su utilización. La amplificación del ADN de *Leishmania* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cruz *et al.* (2002) (41).

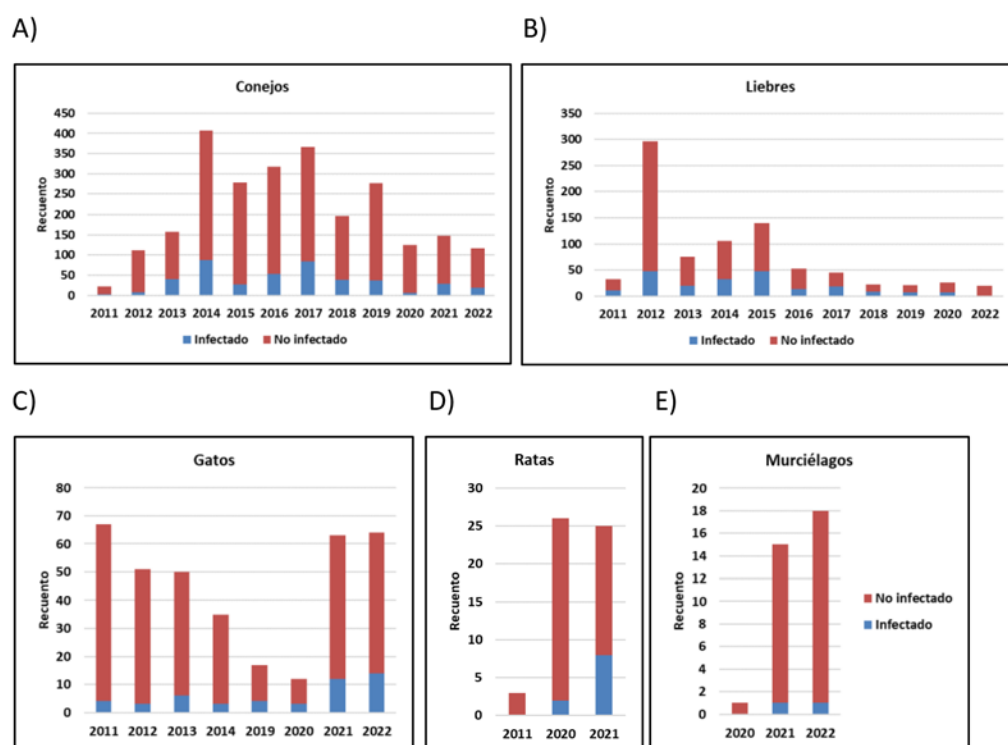
Como se observa en la figura 2, se ha estudiado un mayor número de muestras procedentes de conejos, liebres y gatos con respecto a los otros animales estudiado (ratas y murciélagos). Aun así, se puede indicar que el principal reservorio en el brote ha sido la liebre, la tasa de infección global fue del 25%, mientras que en los otros animales fue de 17% en conejos, 14% en gatos, 19% ratas, y el 6% en murciélagos.

**Figura 2. Detección de *Leishmania infantum* en animales silvestres de la Comunidad de Madrid.**



Aunque el brote se inició en 2009, el estudio sobre los reservorios de animales silvestres se comenzó en 2011, y a partir de este año la sospecha de la implicación de estos animales fue mayor por lo que se aumentaron las capturas como medida de control del brote (Figura 3). Aunque el número de conejos entre los años 2014 y 2019 es superior al número de liebres, se observa que la tasa de infección de liebres es superior. En gatos la tasa de infección es similar, aunque en los últimos años se observa un aumento. Como no se tiene datos previos en ratas y murciélagos, es llamativa la prevalencia de *Leishmania infantum* en ratas en el año 2022.

**Figura 3. Tasa de infección absoluta de los animales silvestres.**

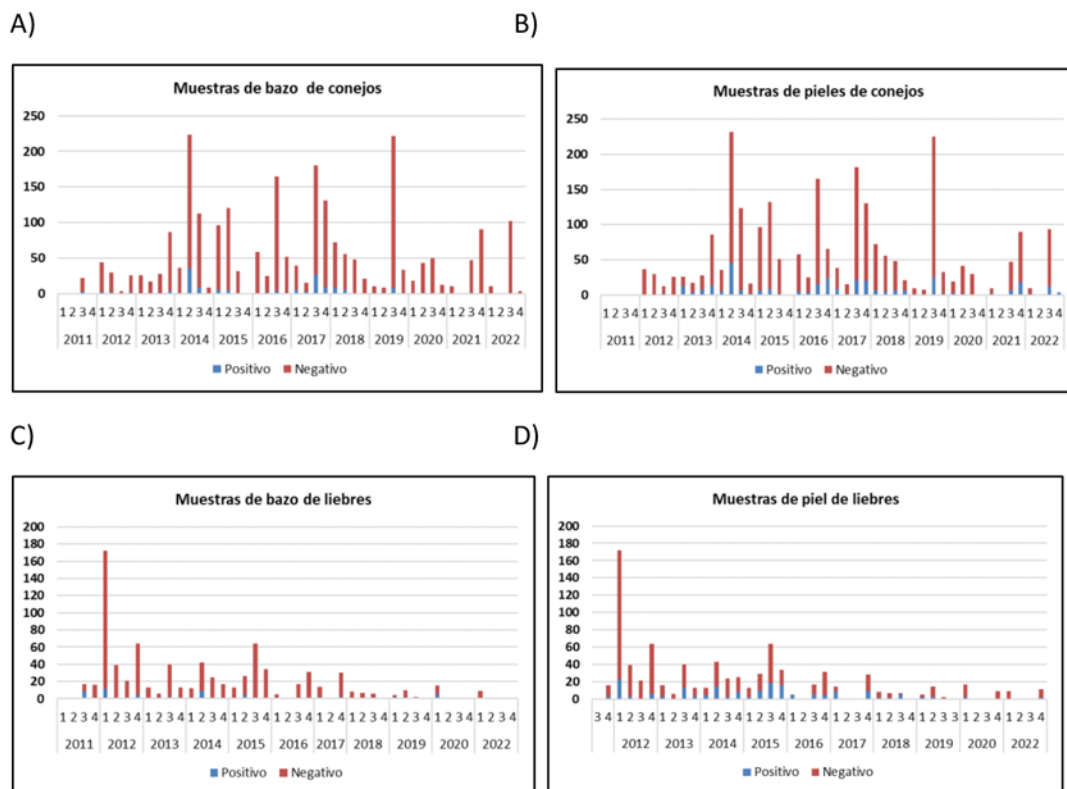


Según se observa en la [figura 4](#) y la [tabla 2](#), la presencia de *L. infantum* es mayoritaria en las muestras de piel tanto en conejos como en liebres. Es importante destacar la prevalencia de *L. infantum* en el bazo de las ratas que es superior con respecto al resto de animales.

**Tabla 2. Detección de *Leishmania* en bazo y piel de los animales silvestres.**

	Bazo			Piel		
	Positivo	Total	%	Positivo	Total	%
<b>Conejo</b>	142	2435	6	322	2445	13
<b>Liebre</b>	56	792	7	172	816	21
<b>Gato</b>	32	357	9	22	262	8
<b>Rata</b>	7	54	13	3	52	6
<b>Murciélago</b>	1	33	3	1	34	3

**Figura 4. Detección de *Leishmania infantum* en bazo y piel de conejos y liebres por trimestres.**



Utilizando como herramienta de trabajo la detección de *Leishmania* mediante la PCR, que, a diferencia de las técnicas serológicas, no presenta la posibilidad de reactividad inespecífica ni reactividad cruzada con otros tripanosomátidos pudimos comprobar que en el brote de leishmaniasis de Fuenlabrada de la CM hasta 2014, las liebres, los conejos y los gatos, aparentemente asintomáticos, estaban infectados con *L. infantum*, con una prevalencia global del 20%. Actualmente incluyendo ratas y murciélagos, la prevalencia global es del 18%. La ausencia o baja prevalencia de lesiones parece ser una característica común en los estudios de otros reservorios, que no sean los perros ([12](#),[17](#),[42](#),[43](#),[45](#)).

Hemos observado que la prevalencia en liebres y conejos fue significativamente mayor con respecto a la prevalencia en los gatos (25%, 17% y 14%, respectivamente). Sin embargo, estos valores son inferiores a los resultados obtenidos mediante estudios serológicos. Moreno *et al.*, (2014) ([46](#)), en esta misma zona geográfica, reportaron una seroprevalencia del 74,1% en liebres, 45,7% en conejos y 9,3% en gatos. Asimismo, García *et al.*, (2014) ([44](#)), describen una seroprevalencia incluso mayor en conejos, del 75,4%; si bien de forma similar a nuestros resultados, observaron que

la detección de la presencia de ADN del parásito fue del 17,4% en piel y del 2,9 % en bazo. Como hemos comentado, la detección de anticuerpos anti-*Leishmania*, no necesariamente distingue la infección con otros tripanosomátidos. Díaz-Saez, *et al.* (2014) (47), en un área endémica de leishmaniasis canina (provincia de Granada), observaron en conejos la presencia de otro parásito *Kinetoplastidae*, *Trypanosoma nabiasi* y cuya prevalencia era elevada, el 82,4% de los animales estaban infectados. En cambio, sólo el 20,7% de ellos estaban infectados con *L. infantum*, observándose un 14,8% de infecciones mixtas. Si bien, ellos observaron que la seroprevalencia no era directamente proporcional a la presencia de parásitos, sus resultados reflejan la posibilidad de reacciones cruzadas entre ambos kinetoplastidos, por lo que hay que tener mucho cuidado en la interpretación de los resultados serológicos, especialmente cuando se utilizan técnicas basadas en antígenos totales, y el punto de corte se define de forma arbitraria por ausencia de estándares. Este hecho puede ser la justificación por la que las seroprevalencias sean más elevadas con respecto a la detección del parásito por métodos moleculares. Si bien en nuestro estudio, no hemos realizado cultivos ni microscopía de las muestras biológicas obtenidas, es importante indicar que los amastigotes de ambos tripanosomátidos son indistinguibles y las formas flageladas de los cultivos pueden inducir a error en su identificación (47). Hay que destacar también que, en otras regiones de nuestro país, se ha comprobado la presencia de *L. infantum* en liebres, con una prevalencia media de 43,6 % y un rango entre 0% y 64,3% (48). Los animales procedentes de la región correspondiente a Madrid presentaron una prevalencia del 60%, este valor es tres veces mayor respecto al valor que hemos obtenido. Esta diferencia podría estar relacionada al hecho de que se tratan de periodos de estudio diferentes, 2004-2010 *vs* 2011-2022, y al pequeño número de especímenes analizados 10 *vs* 3086, respectivamente.

Otro hecho interesante, es la diferencia de la presencia de *Leishmania* en piel y bazo, detectamos un mayor número de casos positivos en piel con respecto a lo encontrado en el bazo, en los conejos 13% *vs* 6%, en las liebres 21% *vs* 6%, relación que se encuentra invertida en las ratas 6% *vs* 13%, siendo similar en gatos y murciélagos. Sólo García *et al.* (47), observaron un patrón similar en conejos. El resto de estudios carecen de esta información o el número de muestras analizadas es limitado. Esta diferencia podría explicar la facilidad que tendría el vector para alimentarse de sangre infectada. De hecho, Molina *et al.* (29) y Jiménez *et al.* (30), comprobaron, por primera vez, mediante xenodiagnóstico, que las liebres y los conejos de este área, infectados naturalmente y aparentemente sanos, podían transmitir *L. infantum* de forma experimental a vectores competentes, *P. perniciosus*. En el primer estudio determinaron que cuatro de las siete liebres infectaron a una media de 4,7 % de los flebotomos. En el segundo, comprobaron que el 50% (5/10) de

los conejos infectaban a un 0,94 % de los vectores. Asimismo, en los casos en los que ha sido posible la caracterización molecular de las cepas de *Leishmania* aisladas de liebres (mediante el estudio de la región ITS-1 e ITS2) los resultados obtenidos coinciden con los observados en las cepas del parásito aisladas de los casos humanos de la misma área geográfica (38,29).

Los parámetros ecológicos que caracterizan a estos animales silvestres, distribución geográfica, biotopo, hábitat, el nicho, la edad de la población, su densidad, dispersión y movimientos son importantes en la comprensión de su papel como reservorios. Como se puede deducir por el conjunto de resultados, tanto nuestros como los de otros autores, hay evidencias suficientes que sugieren que estos animales podrían mantener el parásito en determinadas áreas geográficas. Aunque, es difícil encontrar zonas sin perros que permitan, de una forma natural, evaluar este papel. El reservorio tiene que ser abundante y de hábitos gregarios, estas características las tienen los conejos y las liebres. Si bien, estos animales viven menos que un perro tiene una vida lo suficientemente larga como para garantizar la transmisión. La presencia del parásito en altas proporciones en la piel de estos animales, sin signos aparentes de enfermedad asegura el contacto de *Leishmania* con el vector, que además, encuentra en las madrigueras un biotopo adecuado para vivir. Aunque nuestros resultados muestran que el gato está infectado, la baja prevalencia y el patrón de detección a lo largo de los años estudiados nos permite concluir que el gato no se pueda considerar como un reservorio silvestre en este brote.

Por otra parte, los tratamientos farmacológicos, la utilización de vacunas y el uso en los perros de insecticidas reducen considerablemente el papel del perro como reservorio, por lo que el papel de la fauna silvestre que vive en las proximidades de zonas de reciente urbanización tiene una gran importancia en el futuro y son necesarias medidas de control y prevención específicas. Todas estas razones demuestran la existencia de un ciclo silvestre y periurbano donde los mamíferos silvestres actúan como reservorios distintos de los perros, pudiendo ser una de las razones que justifiquen la aparición de nuevos brotes o un aumento del número de casos. Hay muchas evidencias que podrían sugerir la existencia de un ciclo silvestre periurbano de la enfermedad independiente del ciclo doméstico tradicional que implica a los perros, pudiendo superponerse los dos ciclos por proximidad.

Con nuestros resultados y el conjunto de resultados obtenidos en el contexto del brote, podemos concluir que los conejos y las liebres de la zona de estudio, cumplen todos los requisitos que se postulan para que un animal sea considerado reservorio de una enfermedad, son animales gregarios, con un alto número de individuos, son longevos, pudiendo durar más de una estación de transmisión, su contacto con los flebótomos está asegurado, la infección en ellos es alta, es crónica, en muchos

no aparecen síntomas, y los aislados que se han caracterizado son iguales que a los identificados en el hombre y el vector. Por otro lado, el elevado número de animales silvestres infectados, el elevado número de vectores (con un porcentaje alto de infección), la coincidencia en la caracterización de las cepas y la alta protección de los perros (insecticidas y vacunación) con la seroprevalencia de los perros más baja que en el resto de la Comunidad de Madrid, hacen pensar en la existencia de este ciclo silvestre de la leishmaniasis, pero muy íntimamente unido al ciclo urbano ([Figura 5](#)).

**Figura 5. Descripción de los ciclos silvestre y urbano de la Leishmaniasis en la Comunidad de Madrid.**



Para determinar la importancia que los animales silvestres tienen en la epidemiología de la enfermedad, además de la posibilidad de que los flebotomos se infecten a partir de estos animales y el papel que estos animales juegan como reservorios hay que estudiar el riesgo que implica para la salud humana y animal, fundamentalmente en el caso de los perros y de los gatos. Un requisito importante y que normalmente no se cumplen con estos animales, es el contacto íntimo entre los animales silvestres y los humanos o los perros y gatos. Por otro lado, se sabe que los flebotomos no recorren grandes distancias, por lo tanto, no es probable que se produzca la transmisión. Sin embargo, como se ha demostrado con el brote de leishmaniasis humana en Fuenlabrada, cuando hay un contacto estrecho entre humanos y estos animales silvestres (cuando el hombre entra en el nicho de estos animales como son los parques urbanos), la presencia de los vectores y la alta densidad de población de los reservorios silvestres, la transmisión de la enfermedad se produce y estos animales

pueden llegar a ser los responsables de un brote (49,17). Otra situación diferente es cuando el contacto entre el hombre y los reservorios es más directo, como es el caso de los animales domésticos o de granja o en parques zoológicos.

Los perros y los gatos, en general, siguen siendo los reservorios principales de la enfermedad. En la actualidad debido a que la mayoría de los perros están bien protegidos contra las picaduras de flebotomos con insecticidas y, a menudo, también mediante la utilización de las vacunas que hay en el mercado, los gatos pueden desempeñar un papel epidemiológico importante debido por un lado al gran número de animales y por otro al uso limitado de los insecticidas en gatos. De hecho, en algunas zonas endémicas, tanto los gatos domésticos como los gatos sin dueño superan en número a los perros. La importancia de los gatos como reservorio de *Leishmania* spp., está ganando cada vez más terreno y no sólo porque sea un hospedador accidental (50), pudiendo actuar como (51) reservorios primarios y/o secundarios en la transmisión de *Leishmania* spp. a humanos y también a perros en focos endémicos.

El zorro es el carnívoro silvestre más abundante en Europa, con densidades de población relativamente altas. Además es una especie, que por sus hábitos puede considerarse como una conexión entre los distintos ciclos de la enfermedad: silvestre, rural y urbano (53) y además se ha comprobado que tienen una prevalencia alta y por tanto pueden ser considerados como reservorio de *L. infantum*, aunque todavía haya que hacer estudio para demostrar su capacidad para infectar a los flebotomos (52). También hay varios informes en la literatura sobre lobos infectados, pero el papel de esta especie salvaje en el ciclo epidemiológico de *L. infantum* aún no está claro.

En general, la dispersión geográfica de las Leishmaniasis fundamentalmente se limita principalmente a las zonas más meridionales de Europa, en particular Grecia, Italia, España y Portugal, donde las condiciones climatológicas de la Cuenca Mediterránea son la más favorables para los vectores. En otras zonas de Europa central (Alemania, Suiza) la notificación de este tipo de casos es más escasa (53). Y hasta el momento, los países nórdicos no se conocen la presencia de casos de infecciones en animales por *Leishmania* que no sean perros. Posiblemente el calentamiento global puede cambiar esta circunstancia, por lo que hay que estar alerta (54). Otras circunstancias que hay que valorar son los viajes y el realojamiento (adopciones) de perros y gatos que provienen de zonas endémicas o los movimientos de animales salvajes entre parques zoológicos pueden dar lugar a casos clínicos ocasionales en zonas no endémicas. Por otro lado, no se ha podido comprobar la importancia que tiene la transmisión no vectorial en los animales silvestres, como se ha visto en humanos y en los perros (55).

En la literatura hay una gran cantidad de trabajos que describen la infección por *Leishmania* en diferentes especies de mamíferos distintas de los humanos y los

perros, o al menos se ha visto que han estado en contacto con estos parásitos. Las aves no parecen estar infectadas de forma importante por *Leishmania*. Las observaciones reportadas en mamíferos van desde hallazgos más o menos anecdóticos, en algunos casos, hasta estudios más amplios y detallados ([17](#),[55](#),[56](#),[57](#)).

Muchos de los estudios se basan en la detección de anticuerpos específico frente al parásito, pero también hay otros muchos detectan en diferentes muestras biológicas ADN del parásito. Las técnicas moleculares actuales son muy sensibles, pero un individuo con PCR positiva no significa necesariamente que esté involucrado en la transmisión del parásito y lo mismo pasa cuando se emplean otras técnicas para la detección del parásito.

La falta de conjugados específicos para las diferentes especies de los vertebrados silvestres dificulta la estandarización de las pruebas serológicas y la comparación de datos entre estudios. La utilización, aplicación e interpretación de la serología debe ser utilizada con precaución, ya que los anticuerpos pueden presentar reacciones cruzadas, y pueden dar lugar a falsos positivos. Por otro lado, los valores de los puntos de corte tampoco son homogéneos con lo cual en muchas ocasiones es difícil la comparación de datos y la obtención de resultados válidos.

Uno de los mayores problemas con el que nos encontramos es que sigue siendo difícil determinar realmente si existe una enfermedad o simplemente una infección por el parásito. Muchas de las especies en las que se ha comprobado la presencia del parásito no muestran signos patentes de enfermedad. Por lo tanto, es importante que la definición de infección en los animales silvestres se base en la combinación de los resultados de serología, presencia de anticuerpos específicos y la detección de ADN del parásito.

En conclusión, en las áreas geográficas donde *L. infantum* es endémica en perros y humanos, la infección y/o enfermedad causada por este agente debe estudiarse en otras especies de animales. Los programas de vigilancia y seguimiento deben evaluar la infección en poblaciones domésticas y silvestres y también diagnosticar la enfermedad a nivel individual en animales clínicamente sospechosos. Fundamentalmente para conocer el papel epidemiológico de los diferentes grupos de reservorios en orden de determinar las diferentes estrategias de prevención y control con impacto en la infección en la Salud Pública.

La dinámica de los reservorios de *Leishmania* en el contexto europeo es compleja, ya que cada vez hay más pruebas de que las infecciones por *L. infantum* no se limitan a los perros. Los gatos con dueño pueden considerarse un reservorio adicional importante y, además, muchas otras especies de mamíferos pueden resultar infectados y pueden actuar potencialmente como reservorios. Hay que considerar

que, probablemente, muchas infecciones en animales silvestres sean accidentales, y que debido al comportamiento hematófago oportunista de los flebótomos, pueden originar un brote de leishmaniasis humana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. WHO weekly epidemiological record. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. No. 44, 2002, 77, 365-372.
2. Maxfield, L.; Crane, J.S. Leishmaniasis; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2019. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531456/>
3. World Health Organization. Leishmaniasis Factsheet. Available online: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
4. Cardoso, L.; Schallig, H.; Persichetti, M.F.; Pennisi, M.G. New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other than Dogs. *Pathogens* 2021, 10, 307.
5. Miró, G.; Müller, A.; Montoya, A.; Checa, R.; Marino, V.; Marino, E.; Fuster, F.; Escacena, C.; Descalzo, M.A.; Gálvez, R. Epidemiological Role of Dogs since the Human Leishmaniosis Outbreak in Madrid. *Parasit. Vectors* 2017, 10, 209.
6. Quaresma, P.F.; Rego, F.D.; Botelho, H.A.; da Silva, S.R.; Moura, A.J., Jr.; Teixeira Neto, R.G.; Madeira, F.M.; Carvalho, M.B.; Paglia, A.P.; Melo, M.N.; *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011, 105, 579-585.
7. Ashford, R.W. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. *Clin. Dermatol.* 1996, 14, 523-532.
8. Roque, A.L.R.; Jansen, A.M. Wild and Synanthropic Reservoirs of *Leishmania* Species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* 2014, 3, 251-262.
9. Baneth G, Aroch I. (2008). Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J.*; 175(1):14-5
10. 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 leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 28; 165(1-2):1-18.

11. 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. J Clin Microbiol; 39(2):560-3.
12. Quinnell RJ, Courtenay O.(2009).Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis.Parasitology.;136(14):1915-34.
13. Pennisi, M.G.; Cardoso, L.; Baneth, G.; Bourdeau, P; Koutinas, A.; Miró, G.; Oliva, G.; Solano-Gallego, L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. Parasit. Vectors 2015, 8, 302.
14. Can, H.; Döşkaya, M.; Özdemir, H.G.; Sahar, E.A.; Karakavuk, M.; Pektaş, B.; Karakuş, M.; Töz, S.; Caner, A.; Döşkaya, A.D.; *et al.* Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. Exp. Parasitol. 2016, 167, 109-114.
15. Pasa, S.; Tetik Vardarlı, A.; Erol, N.; Karakuş, M.; Töz, S.; Atasoy, A.; Balcıoğlu, İ.C.; Emek Tuna, G.; Ermiş, Ö.V.; Ertabaklar, H.; *et al.* Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. Vet. Parasitol. 2015, 212, 389-392.
16. Pereira, A.; Parreira, R.; Cristóvão, J.M.; Castelli, G.; Bruno, F.; Vitale, F.; Campino, L.; Maia, C. Phylogenetic insights on *Leishmania* detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers. Infect. Genet. Evol. 2020, 77, 104069.
17. Millán, J.; Zanet, S.; Gomis, M.; Trisciungio, A.; Negre, N.; Ferroglio, E. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). Transbound. Emerg. Dis. 2011, 58, 352-357.
18. Pennisi, M.G.; Lupo, T.; Malara, D.; Masucci, M.; Migliazzo, A.; Lombardo, G. Serological and molecular prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from Southern Italy. J. Feline. Med. Surg. 2012.
19. Otranto, D.; Napoli, E.; Latrofa, M.S.; Annoscia, G.; Tarallo, V.D.; Greco, G.; Lorusso, E.; Gulotta, L.; Falsone, L.; Basano, F.S.; *et al.* Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. Vet. Parasitol. 2017, 236, 144-151.
20. Maia, C.; Gomes, J.; Cristóvão, J.; Nunes, M.; Martins, A.; Rebêlo, E.; Campino, L. Feline *Leishmania infection* in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. Vet. Parasitol. 2010, 174, 336-340

21. Lucas, J.; Lourenço, M.; Minuzzi-souza, T.T.C.; Silva, L.R.; Oliveira, A.M. High Frequency of Trypanosomatids in Gallery Forest Bats of a Neotropical Savanna. *Acta Trop.* 2018, 177, 200-206.
22. Brandão-Filho, S.P.; Brito, M.E.; Carvalho, F.G.; Ishikaw, E.A.; Cupolillo, E.; Floeter-Winter, L.; Shaw, J.J. Wild and Synanthropic Hosts of *Leishmania* (Viannia) braziliensis in the Endemic Cutaneous Leishmaniasis Locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2003, 97, 291-296.
23. Tonelli, G.B.; Tanure, A.; Rego, F.D.; Carvalho, G.M.L.; Stumpp, R.; Ássimos, G.R.; Campos, A.M.; Lima, A.C.V.M.; Gontijo, C.M.F.; Paz, G.F.; *et al.* *Leishmania* (Viannia) braziliensis Infection in Wild Small Mammals in Ecotourism Area of Brazil. *PLoS ONE* 2017, 12.
24. De Lima, H.; De Guglielmo, Z.; Rodriguez, A.; Convit, J.; Rodriguez, N. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002, 97, 169-174.
25. Trüeb, I.; Portela, R.D.; Franke, C.R.; Carneiro, I.O.; Ribeiro, G.J.; Soares, R.P.; Barrouin-Melo, S.M. Trypanosoma cruzi and *Leishmania* sp. Infection in Wildlife from Urban Rainforest Fragments in Northeast Brazil. *J. Wildl. Dis.* 2018, 54, 76-84.
26. Cardoso, R.M.; De Araújo, N.S.L.; Romero, G.A.S.; Souza, T.T.C.M.; Dietrich, A.G.; Mendes, J.D.; Reis, M.L.; Ferreira, J.B.C.; Hecht, M.M.; Gurgel-Gonçalves, R. Expanding the Knowledge about *Leishmania* Species in Wild Mammals and Dogs in the Brazilian Savannah. *Parasit. Vectors* 2015, 8, 171.
27. Cássia-Pires, R.; Boité, M.C.; D'Andrea, P.S.; Herrera, H.M.; Cupolillo, E.; Jansen, A.M.; Roque, A.L.R. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, e3389.
28. Voltarelli, E.M.; Arraes, S.M.A.A.; Perles, T.F.; Lonardon, M.V.C.; Teodoro, U.; Silveira, T.G.V. Serological survey for *Leishmania* sp. Infection in wild animals from the municipality of Maringá, Paraná state, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2009, 15, 732-744.
29. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol.* ;190(1-2):268-71.

30. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R., (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol.*; 202(3-4):296-300.
31. Akhoundi, M.; Downing, T.; Votýpka, J.; KKuhls, K.; Lukeš, J.; Cannet, A.; Ravel, C.; Marty, P.; Delaunay, P.; Kasbari, M.; *et al.* *Leishmania* Infections: Molecular Targets and Diagnosis. *Mol. Asp. Med.* 2017, 57, 1-29.
32. Schallig, H.D.F.H.; da Silva, E.S.; van der Meide, W.F.; Schoone, G.J.; Contifjo, C.M.F. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A Potential Reservoir Host for Zoonotic Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007, 7, 387-393.
33. Lima, B.S.; Dantas-Torres, F.; de Carvalho, M.R.; Marinho-Junior, J.F.; de Almeida, E.L.; Brito, M.E.; Gomes, F.; Brandão-Filho, S.P. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2013, 107, 592-597.
34. Souza, T.D.; Turchetti, A.P.; Fujiwara, R.T.; Paixão, T.A.; Santos, R.L. Visceral Leishmaniasis in Zoo and Wildlife. *Vet. Parasitol.* 2014, 200, 233-241.
35. Cardoso, L.; Schallig, H.; Persichetti, M.F.; Pennisi, M.G. New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other Than Dogs. *Pathogens* 2021, 10, 307. [https:// doi.org/10.3390/pathogens10030307](https://doi.org/10.3390/pathogens10030307)
36. Tsokana, C.N.; Sokos, C.; Giannakopoulos, A.; Mamuris, Z.; Birtsas, P.; Papaspyropoulos, K.; Valiakos, G.; Spyrou, V.; Lefkaditis, M.; Chatzopoulos, D.C.; *et al.* First evidence of *Leishmania* infection in European brown hare (*Lepus europaeus*) in Greece: GIS analysis and phylogenetic position within the *Leishmania* spp. *Parasitol. Res.* 2016, 115, 313-321.
37. Arce, A.; Estirado, A.; Ordobas, M.; Sevilla, S.; García, N.; Moratilla, L.; de la Fuente, S.; Martínez, A.M.; Pérez, A.M.; Aránguez, E.; *et al.* Re-emergence of leishmaniasis in Spain: Community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013, 18, 20546.
38. Chicharro, C.; Llanes-Acevedo, I.P.; García, E.; Nieto, J.; Moreno, J.; Cruz, I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013, 18, 20545.
39. Risueño, J.; Ortuño, M.; Pérez-Cutillas, P.; Goyena, E.; Maia, C.; Cortes, S.; Campino, L.; Bernal, L.J.; Muñoz, C.; Arcenillas, I.; *et al.* Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle

- in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. *Vet. Parasitol.* 2018, 259, 61-67.
40. Ortuño, M.; Latrofa, M.S.; Iborra, M.A.; Pérez-Cutillas, P.; Bernal, L.J.; Risueño, J.; Muñoz, C.; Bernal, A.; Sánchez-Lopez, P. F.; Segovia, M.; *et al.* Genetic diversity and phylogenetic relationships between *Leishmania infantum* from dogs, humans and wildlife in south-east Spain. *Zoonoses Public Health* 2019, 66, 961-973.
41. Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S, Alvar J; Spanish HIV-*Leishmania* Study Group. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Apr;96 Suppl 1: S 185-9.
42. Martín-Sánchez J1, 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 (3-4):267-73.
43. Maia C, Nunes M, Campino L. (2007). Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 8(4):555-9.7
44. García N, Moreno I, Alvarez J, de la Cruz ML, Navarro A, Pérez-Sancho M, García-Seco T, Rodríguez-Bertos A, Conty ML, Toraño A, Prieto A, Domínguez L, Domínguez M. (2014). Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain. *Biomed Res Int.*:318254
45. Sherry K, Miró G, Trotta M, Miranda C, Montoya A, Espinosa C, Ribas F, Furlanello T, Solano-Gallego L. (2011) A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis.*;11(3):239-45.
46. Moreno I, Álvarez J, García N, de la Fuente S, Martínez I, Marino E, Toraño A, Goyache J, Vilas F, Domínguez L, Domínguez M. (2014). Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet Parasitol.* 31;199(3-4):
47. Díaz-Sáez V, Merino-Espinosa G, Morales-Yuste M, Corpas-López V, Pratlong F, Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J. (2014). High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine

- leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Vet Parasitol.*28; 202 (3-4):119-27.
48. Ruiz-Fons F, Ferroglio E, Gortázar C. (2013). *Leishmania infantum* in free ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro Surveill.*25;18(30):20541.
  49. Johnson, R.N.; Young, D.G.; Butler, J.F.; Bogaert-Diaz, H. Possible Determination of the Vector and Reservoir of Leishmaniasis in the Dominican Republic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992, 46, 282-287.
  50. Papadogiannakis, E.; Spanakos, G.; Kontos, V.; Menounos, P.G.; Tegos, N.; Vakalis, N. Molecular Detection of *Leishmania infantum* in Wild Rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health* 2010, 57, 2009-2011.
  51. Pourmohammadi, B.; Motazedian, M.H.; Kalantari, M. Rodent Infection with *Leishmania* in a New Focus of Human Cutaneous Leishmaniasis, in Northern Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2008, 102, 127-133.
  52. Naucke, T.J.; Amelung, S.; Lorentz, S. First Report of Transmission of Canine Leishmaniosis through Bite Wounds from a Naturally Infected Dog in Germany. *Parasit. Vectors* 2016, 9, 1-4.
  53. Karayiannis, S.; Ntais, P.; Messaritakis, I.; Tsirigotakis, N.; Dokianakis, E.; Antoniou, M. Detection of *Leishmania infantum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Greece. *Parasitology* 2015, 142, 1574-1578.
  54. Naucke, T.J.; Lorentz, S. First Report of Venereal and Vertical Transmission of Canine Leishmaniosis from Naturally Infected Dogs in Germany. *Parasit. Vectors* 2012, 5, 1-5.
  55. Masoumeh, A.; Kouros, A.; Mohsen, K.; Hossein, M.M.; Qasem, A.; Djaefar, M.F.M.; Esmail, N.M.; Tahereh, D. Laboratory Based Diagnosis of Leishmaniasis in Rodents as the Reservoir Hosts in Southern Iran, 2012. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2014, 4, S575-S580.
  56. Shapiro, J.T.; da Costa Lima Junior, M.S.; Dorval, M.E.; de Oliveira, F.A.; Cepa Matos, M.F.; Bordignon, M.O. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Trop.* 2013, 128, 171-174.
  57. Risueño, J.; Ortuño, M.; Pérez-Cutillas, P.; Goyena, E.; Maia, C.; Cortes, S.; Campino, L.; Bernal, J.; Muñoz, C.; Arcenillas, L.; *et al.* Epidemiological and Genetic Studies Suggest a Common *Leishmania infantum* Transmission Cycle in Wildlife, Dogs and Humans Associated to Vector Abundance in Southeast Spain. *Vet. Parasitol.* 2018, 259, 61-67.

58. Azami-Conesa, I.; Gómez-Muñoz, M.T.; Martínez-Díaz, R.A. A Systematic Review (1990-2021) of Wild Animals Infected with Zoonotic Leishmania. *Microorganisms* 2021, 9, 1101. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051101>

## CAPÍTULO 9

# Estudios entomológicos de flebotomos en la Comunidad de Madrid

Maribel Jiménez<sup>1,4</sup>, Estela González<sup>1</sup>, Andrés Iriso<sup>2</sup>, Ramón Díaz-Regañón<sup>1</sup>, Ana Tello<sup>3</sup>, Sonia Hernández<sup>1</sup>, Fernando Fúster<sup>2</sup>, Silvia Miguelañez<sup>1</sup>, Inés Martín-Martín<sup>1</sup>, Ricardo Molina<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Entomología Médica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>2</sup> Sección de Zoonosis y Riesgos Biológicos Área de Vigilancia de Riesgos Ambientales en Salud. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid.

<sup>3</sup> Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

<sup>4</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

## INTRODUCCIÓN

La vigilancia y el estudio de los vectores implicados en los focos de leishmaniasis es fundamental para un mejor conocimiento del papel que juegan en la transmisión de *Leishmania* spp. y así desarrollar y ejecutar programas de control eficientes todo ello en el contexto de la iniciativa «Una Sola Salud – *One Health*» (1,2).

En la Comunidad de Madrid (CM) solo dos especies de flebotomos de las siete descritas en esta región —*Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921— pueden ser vectores de *Leishmania infantum*, siendo *P. perniciosus* su principal vector (3).

A mediados de 2010 los sistemas de vigilancia epidemiológica de la CM alertaron de un aumento inusual de casos de leishmaniasis humana en cuatro municipios del suroeste de la CM, fundamentalmente en el de Fuenlabrada y municipios colindantes como Leganés, Getafe y Humanes de Madrid, dando lugar al mayor brote comunitario de leishmaniasis humana en Europa. Todos estos municipios presentan la particularidad de situarse en las inmediaciones de un parque forestal periurbano de nueva creación, Bosquesur, con una abundante presencia de lepóridos. A partir de este momento, el Laboratorio de Entomología Médica (LEM) del CNM,

ISCIII elaboró un programa de estudio y vigilancia de flebotomos en los municipios afectados por este brote, en colaboración con la Dirección de Salud Pública de la CM ([Figura 1](#)). Se realizaron estudios de xenodiagnóstico directo para evaluar la posible implicación de liebres y conejos como reservorios en un ciclo silvestre de leishmaniasis ([4,5](#)). Además, se planteó la ejecución de un plan de muestreo anual de flebotomos en las zonas de riesgo identificadas, especialmente en aquellas con presencia de casos humanos de leishmaniasis. Hay que destacar que desde el inicio del brote comunitario se han notificado un total de 782 casos asociados al brote ([6](#)).

La vigilancia entomológica tiene lugar en los meses en los que el vector se muestra activo, entre abril-mayo/octubre-noviembre, dependiendo de las condiciones climáticas, en las zonas de riesgo identificadas. Una parte importante de esas tareas de vigilancia se desarrollan en el marco de un contrato de servicios competitivo, suscrito entre la Consejería de Sanidad de la CM y el ISCIII, denominado «Análisis para la vigilancia del vector y de los reservorios silvestres transmisores de la leishmaniasis en la Comunidad de Madrid». Los trabajos se realizan en coordinación con el Área de Vigilancia de Riesgos Ambientales en Salud de la Subdirección General de Higiene, Seguridad Alimentaria y Ambiental, Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la CM.

Los muestreos de flebotomos se realizan con trampas adhesivas y trampas luminosas con un triple objetivo: a) identificar y estimar las densidades del vector/vectores potenciales a partir de las capturas con trampas adhesivas, y describir su dinámica estacional en la zona de estudio; b) determinar los niveles de infección por *L. infantum* en las hembras capturadas, mediante disección y posterior aislamiento de flagelados para su cultivo y caracterización molecular, y c) realizar estudios moleculares con los especímenes recolectados con trampas, tanto de luz como adhesivas, para conocer las preferencias alimentarias de las hembras capturadas con sangre en sus estómagos, así como para la detección de ADN de *L. infantum* en los flebotomos capturados.

La información resultante de estos estudios ha sido fundamental para guiar de una manera más clara y precisa la elección de las medidas de control más eficaces en las zonas afectadas ([2](#)). Así mismo, es muy útil para orientar la vigilancia en otras zonas de la CM en las que se den las mismas condiciones medioambientales, frenando así la aparición de nuevos casos de leishmaniasis humana.

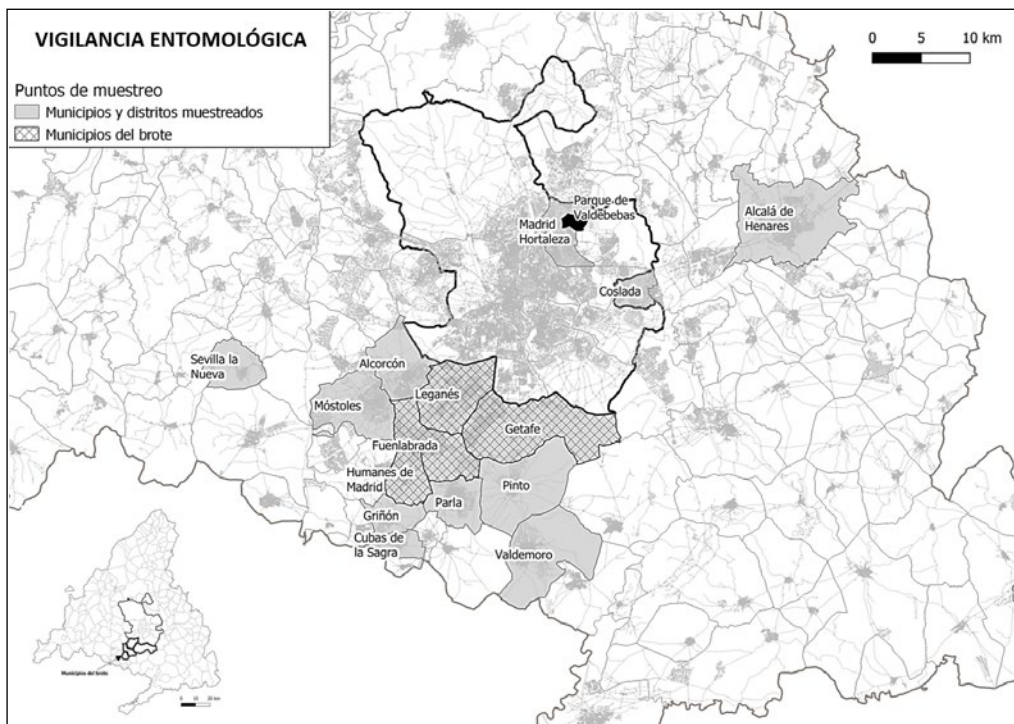
En lo que se refiere a los estudios de vigilancia de flebotomos y de xenodiagnóstico directo en lepidópteros realizados desde 2011, estos han sido muy relevantes dando lugar a numerosas publicaciones de ámbito internacional. Los resultados de los trabajos llevados a cabo durante los primeros años de vigilancia entomológica han quedado recogidos en varios capítulos que conformaron el libro «Brote de Leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid» editado

por la Consejería de Sanidad, Dirección de Salud Pública, CM (7). Así mismo, un resumen de los resultados de la vigilancia entomológica ha quedado recogido en el libro «Programas de Vigilancia Microbiológica del Centro Nacional de Microbiología», editado por el ISCIII, dentro del capítulo correspondiente al Programa de Leishmaniasis Humana en el Area-9 de la Comunidad Autónoma de Madrid (8).

El cambio global, fundamentalmente la modificación del uso del suelo con la creación de un nuevo parque, Bosquesur, ha favorecido la proliferación de lepidóridos en la zona, contribuyendo al mantenimiento de elevadas densidades de flebotomos, siendo en gran medida responsable de la aparición de este brote.

En la [Figura 1](#) se muestra un mapa parcial de la CM con los municipios situados en el suroeste de esta Comunidad afectados por el brote de leishmaniasis, en los que se han realizado los muestreos de flebotomos a lo largo de más de una década. Igualmente, aparecen resaltados otros municipios colindantes o no, con aquellos afectados por el brote, en los que se han llevado a cabo muestreos de flebotomos en los últimos años. Por otra parte, se ha trabajado en otras zonas del municipio de Madrid, como el Parque de Valdebebas, por reunir características y condiciones medioambientales similares a las del parque forestal de Bosquesur. Todos estos trabajos quedan recogidos en este capítulo.

**Figura 1. Mapa de los municipios donde se han realizado los estudios entomológicos.**  
Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).



## METODOLOGÍA EMPLEADA

### Métodos de muestreo

Los muestreos se realizan utilizando dos tipos de trampas, cuyas características se detallan a continuación:

#### Trampas de luz

Las trampas de luz tipo CDC (John W. Hock®) son trampas de atracción en las que los flebotomos son atraídos por una fuente de luz y succionados por la acción de un ventilador al acercarse a la trampa. Estas trampas constan de una bombilla incandescente y un ventilador, conectados a una batería, y una jaula. Los flebotomos quedan atrapados en la jaula sin posibilidad de salir debido a la permanente corriente de aire ejercida por el ventilador ([Figura 2A](#)).

**Figura 2. A. Trampa de luz tipo CDC; B. Trampa adhesiva (Fuente: LEM, CNM).**



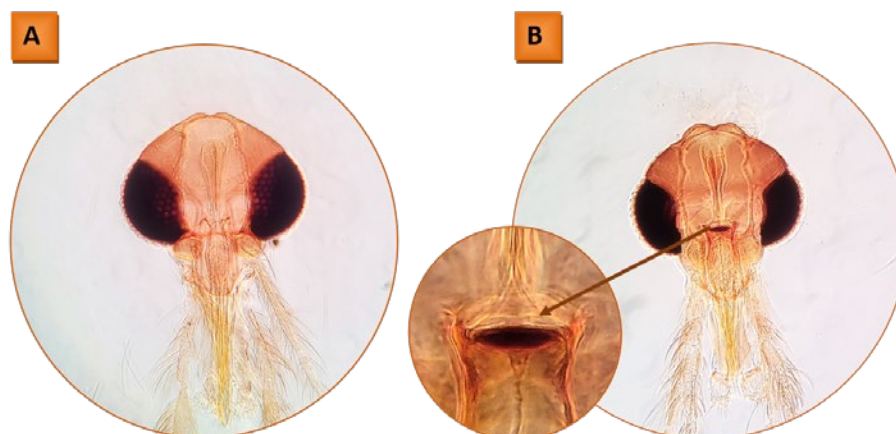
### Trampas adhesivas

Las trampas adhesivas se preparan con hojas de papel de 20 cm X 20 cm impregnadas en aceite de ricino ([Figura 2B](#)) que se colocan en las proximidades de los sitios donde pueden encontrarse los flebotomos. Cuando salen a alimentarse los flebotomos, quedan adheridos a las mismas, permitiendo determinar la densidad de flebotomos capturados, mediante el cálculo del número de flebotomos por m<sup>2</sup> de superficie muestreada (flebotomos/m<sup>2</sup>). Para el cálculo de la superficie se ha de tener en cuenta que cada cara de una trampa tiene una superficie de 400 cm<sup>2</sup>, y que los flebotomos pueden quedarse adheridos por ambas caras, por lo que la superficie total de captura por trampa es de 800 cm<sup>2</sup>, lo que equivale a 0,08 m<sup>2</sup>.

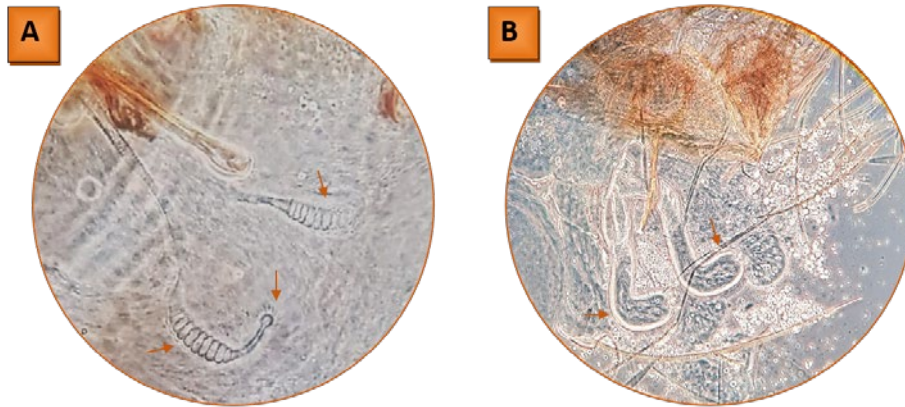
### Clasificación taxonómica

Los flebotomos, machos y hembras, capturados con trampas adhesivas, se separan utilizando un pincel y se colocan en alcohol de 96%, posteriormente se conservan en alcohol de 70% a 4 °C hasta que son identificados taxonómicamente. La cabeza y la genitalia son posteriormente montadas en líquido de Hoyer ([Figura 3A](#), [3B](#), [Figura 4A](#), [4B](#) y [Figura 5A](#) y [5B](#)), respectivamente.

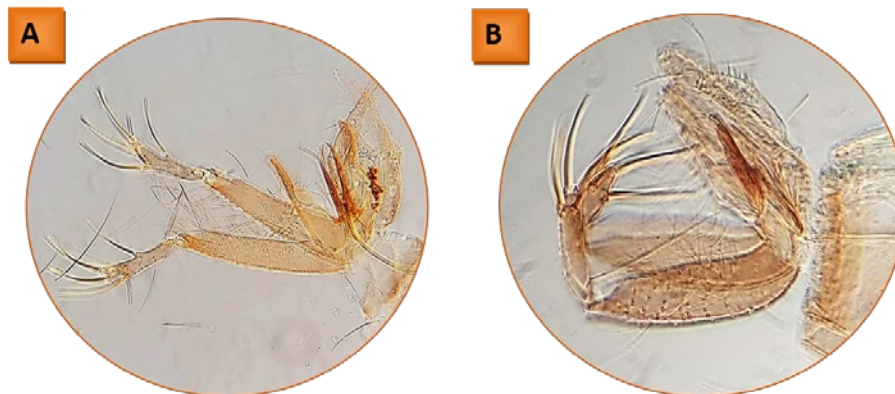
**Figura 3. A. Cabeza de una hembra de *P. perniciosus*; B. Cabeza de una hembra de *Sergentomyia minuta* con detalle del cibario (Fuente: LEM, CNM).**



**Figura 4. A. Genitalia de una hembra de *P. perniciosus*; B. Genitalia de una hembra de *S. minuta* (Fuente: LEM, CNM).**



**Figura 5. A. Genitalia de un macho de *P. perniciosus*; B. Genitalia de un macho de *S. minuta* (Fuente: LEM, CNM).**



Los machos y hembras de flebotomos capturados con trampas CDC que llegan al laboratorio vivos, son separados en tubos diferentes. Las hembras son procesadas directamente mediante disección y aquellas que no sobreviven, así como las que presentan sangre en el tubo digestivo se guardan en etanol de 70% a 4 °C para estudios moleculares posteriores ([Figura 6](#)).

**Figura 6. Detalle de flebotomos. Machos, flechas verdes; hembras, flechas rojas.**

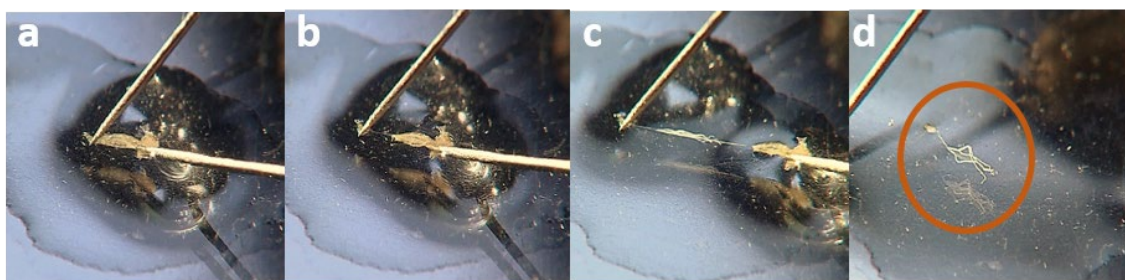


(Fuente: LEM, CNM).

### Disección de hembras de flebotomos capturadas con trampas CDC

Las hembras de flebotomos se anestesian con dióxido de carbono y se depositan en una placa de Petri que contiene PBS al que se añade una gota de detergente líquido lo que permite disolver las ceras presentes en la cutícula del insecto, facilitando su manipulación. Las disecciones de hembras de flebotomos se realizan con ayuda de un microscopio estereoscópico y agujas entomológicas, permitiendo por un lado la separación de la genitalia y la cabeza y, por otro, la extracción del tubo digestivo que es examinado bajo un microscopio óptico en busca de flagelados. El examen conjunto de la cabeza y genitalia permite además su clasificación taxonómica (Figura 7).

**Figura 7. A, B y C. Secuencia de la extracción del tubo digestivo de una hembra de flebotomo con la ayuda de agujas entomológicas; D. Detalle del tubo digestivo (Fuente: LEM, CNM).**

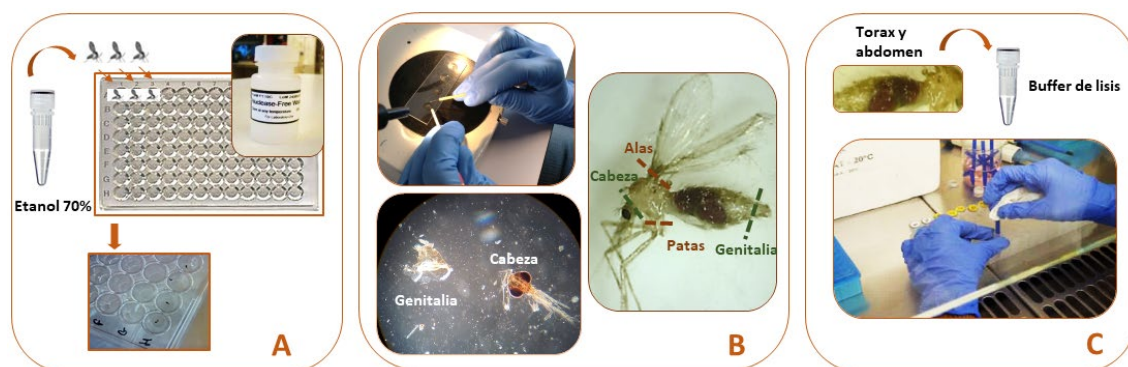


## Estudios moleculares

### Extracción de ADN de flebotomos

Los flebotomos conservados en etanol de 70% a 4 °C se someten individualmente a ocho lavados de cinco minutos cada uno en placas de ELISA (Figura 8A). Posteriormente se observan en un microscopio estereoscópico Meiji EMZ-TR (Meiji Techno Co. Ltd, Tokyo, Japan) (Figura 8B) para confirmar la presencia o ausencia de sangre, así como la cantidad de sangre ingerida en su abdomen según la clasificación de Delmatova y Demina (1971) (9). Las hembras de flebotomo se diseccionan con la ayuda de agujas entomológicas estériles y en condiciones de esterilidad, con el uso de un mechero Bunsen. Se eliminan las patas y las alas, ya que pueden interferir en los estudios moleculares, y se separan la cabeza y la genitalia que, posteriormente, se montan en un portaobjetos con una gota de «líquido de Hoyer». A continuación, se llevan a una estufa a 50 °C durante 48 horas con el fin de aclarar las estructuras internas (Figura 8B). Transcurridas 48 horas de aclarado en el «líquido de Hoyer», se observan las espermatecas y las cabezas de los flebotomos en un microscopio Carl Zeiss Standard 25 (Zeiss, Alemania) con el fin de identificar la especie a la que pertenecen, mediante los criterios morfológicos de Abonnenc y Minter (1965) (Ver Figuras 3, 4 y 5).

**Figura 8. Extracción de ADN de flebotomos; A. Eliminación de etanol mediante lavados en agua destilada libre de nucleasas; B. Disección de hembra de flebotomo; C. Lisis mecánica del tórax y abdomen en buffer de lisis (Fuente: LEM, CNM).**



Para la extracción de ADN de los flebotomos, el tórax y el abdomen son lisados de forma mecánica, con ayuda de pistilos estériles, en buffer de lisis. A continuación, se realiza una lisis con proteinasa K e incubación durante toda la noche a 56 °C. Transcurrido este tiempo se continúa con la purificación de ADN en columnas, con el KIT comercial *Speedtools Tissue DNA Extraction Kit* (Biotools B&M Labs, Madrid, España) (Figura 8C). Finalmente, el ADN es eluido en 100 µl de H<sub>2</sub>O

estéril libre de nucleasas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Una vez realizada la extracción, se mide la concentración y pureza del ADN extraído mediante el espectrofotómetro Nano™ Drop One (Thermo Scientific™). Posteriormente, las muestras son almacenadas hasta su análisis a -20 °C.

#### Estudio de las preferencias alimentarias de las hembras de *Phlebotomus perniciosus* y *Sergentomyia minuta* capturadas y detección de *Leishmania* sp.

El análisis de la sangre ingerida por las hembras capturadas se realiza mediante amplificación de un fragmento de 359 pb de la región conservada del gen *cytb* presente en el ADN mitocondrial de vertebrados, siguiendo los protocolos descritos previamente (10). Los productos de PCR obtenidos son purificados utilizando el kit *Speedtools PCR Clean-up kit* (Biotools B&M Labs, Madrid, España) y posteriormente secuenciados con el secuenciador ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems®, EEUU). Las secuencias nucleotídicas son analizadas mediante los programas bioinformáticos ChromasPro (McCarthy, Queensland, Australia) y con el programa DNASTAR (Lasergen v7.1®, Madison, WI). El estudio de las homologías con las secuencias en las bases de datos de secuencias GenBank se realiza con el software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Para la detección de *L. infantum* en *P. perniciosus*, el ADN obtenido de las hembras de estos flebotomos se utiliza en un protocolo de PCR basado en la amplificación de un fragmento de 120 pb que se corresponde con una región conservada del ADNk, siguiendo los protocolos descritos previamente, con algunas modificaciones (10,11). Además, con el fin de caracterizar los aislados de *Leishmania* sp., se realizan las amplificaciones de los fragmentos correspondientes a las regiones transcritas internas, ITS1 (319 pb) e ITS2 (740 pb) de los genes ribosomales, seguidas de la secuenciación de las mismas, utilizando los protocolos detallados previamente (11,12,13).

Todas las reacciones de PCR correspondientes a los diferentes protocolos se llevan a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster, CA). En todas las reacciones de PCR se incluyen controles negativos (agua destilada), blancos de extracción de ADN y controles positivos. Por otro lado, todas las *masters mix* utilizadas en los diferentes protocolos de PCR se realizan en una cabina de flujo laminar libre de ADN, posteriormente se añaden las muestras problema en otra cabina utilizada para este fin.

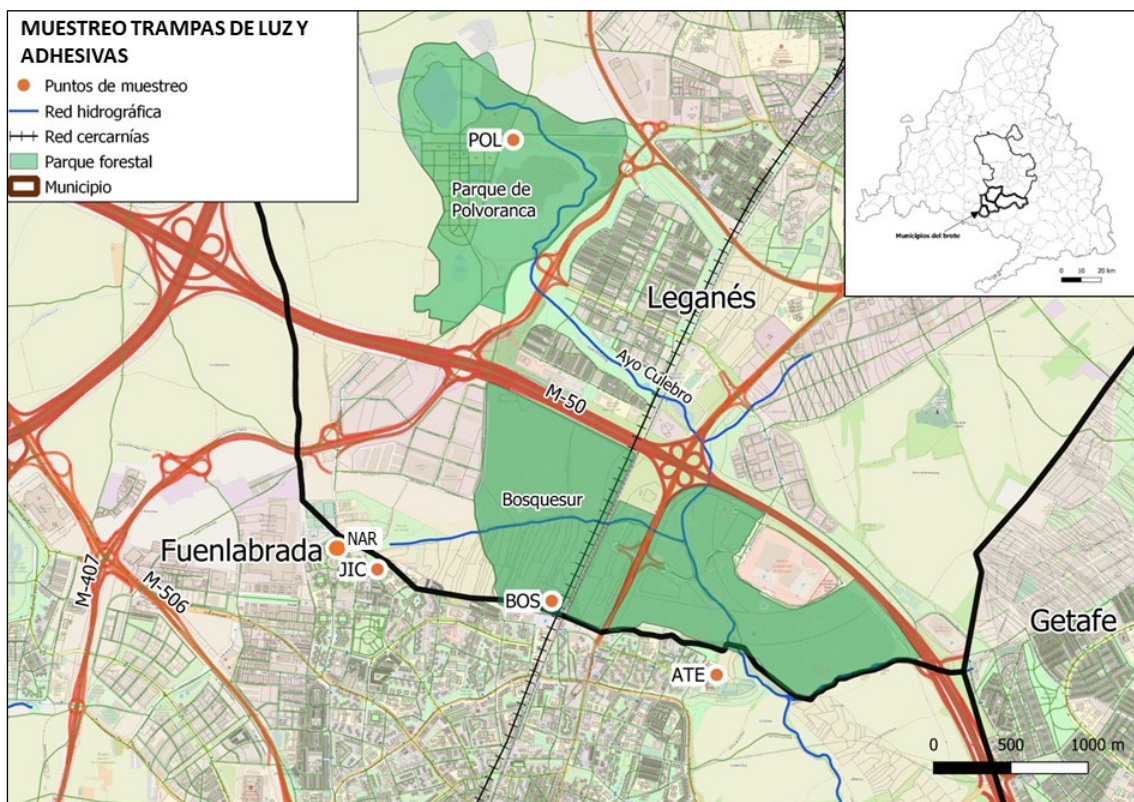
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Muestreos entomológicos realizados por el Laboratorio de Entomología Médica

#### Área de estudio, capturas de flebotomos y estudios moleculares

Para la realización de los muestreos intensivos de flebotomos se seleccionaron cuatro estaciones de muestreo y en cada una de ellas se eligieron dos puntos para la colocación de las trampas de luz, tipo CDC. Tres de las estaciones de muestreo se seleccionaron en el municipio de Fuenlabrada, en el Centro de Educación Especial Sor Juana Inés de la Cruz (JIC), Centro de Educación Ambiental de Bosquesur (BOS) y en el Instituto de Educación Secundaria (IES) Atenea (ATE) y la cuarta, en el municipio de Leganés, en el Centro de Educación Ambiental de Polvoranca (POL). Tres de estas cuatro estaciones se encuentran situadas adyacentes al área urbana y próximas al parque periurbano Bosquesur, y la cuarta dentro del parque (Figura 9). La altitud de estas estaciones oscila entre 655 y 691 m.

**Figura 9. Mapa de la zona donde se lleva a cabo el estudio entomológico intensivo y localización de las estaciones de muestreo. Estaciones de muestreo en los municipios de Fuenlabrada (JIC, BOS y ATE) y Leganés (POL). NAR. Punto de muestreo que se corresponde a una vivienda del barrio de «El Naranjo» de Fuenlabrada. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



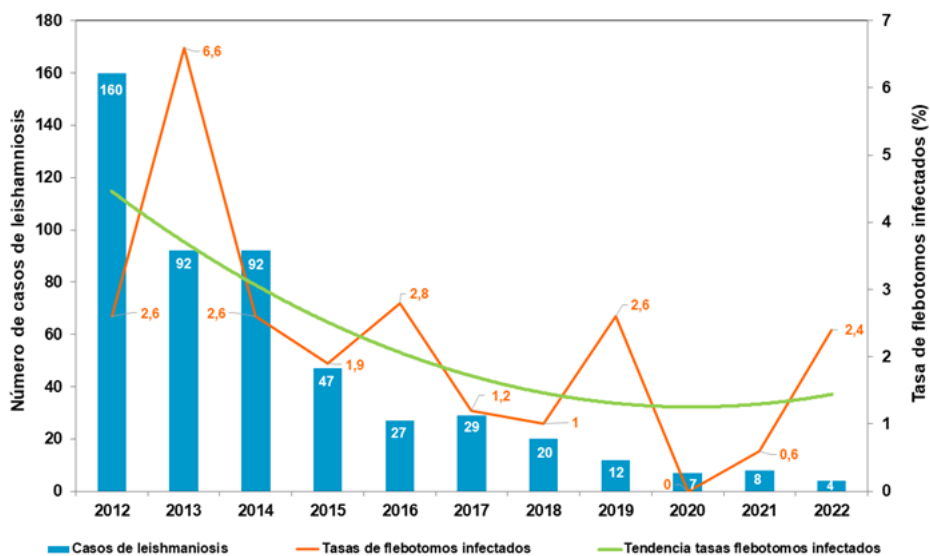
En los muestreos intensivos los flebotomos fueron capturados en las cuatro estaciones seleccionadas durante el periodo de actividad de los flebotomos, de mayo a octubre de 2012, 2013 y 2014 respectivamente. Todos los meses y durante dos noches consecutivas se colocaron en cada estación de muestreo 20 trampas adhesivas (20 x 20 cm) y 2 trampas de luz tipo CDC, estas últimas reemplazadas a las 24 horas ([Figuras 2A y 2B](#)). El objetivo del trabajo fue conocer la fenología de *P. perniciosus* en el foco de leishmaniasis y estudiar su relación con los niveles de infección por *L. infantum* en las hembras capturadas ([11](#)).

A partir de 2015 y hasta la actualidad los muestreos solo se realizan con trampas tipo CDC en las cuatro estaciones de muestreo citadas anteriormente. Durante los meses de actividad de los flebotomos se coloca en cada estación una sola trampa de luz, en uno de los dos puntos de muestreo de cada una de las estaciones ([Figura 9](#)).

En el plan de muestreo diseñado por el LEM en la zona del brote, desde 2012 a 2022, se han capturado un total de 58.520 flebotomos de los cuales n=45.959 fueron clasificados taxonómicamente como *P. perniciosus* y n=12.561 como *S. minuta*. En la [Tabla 1](#) aparecen desglosados los datos de las capturas realizadas por año y tipo de trampa.

La identificación taxonómica sitúa a *P. perniciosus* como la especie mayoritaria en el foco, con un promedio de densidad de 193,6 flebotomos/m<sup>2</sup> calculada a partir de las capturas realizadas con las trampas adhesivas a lo largo del periodo de actividad correspondiente a los tres años de muestreo intensivos 2012-2014 ([11](#)).

**Figura 10. Evolución de las tasas de infección de *P. perniciosus* en relación con el número de casos de leishmaniasis humana.**



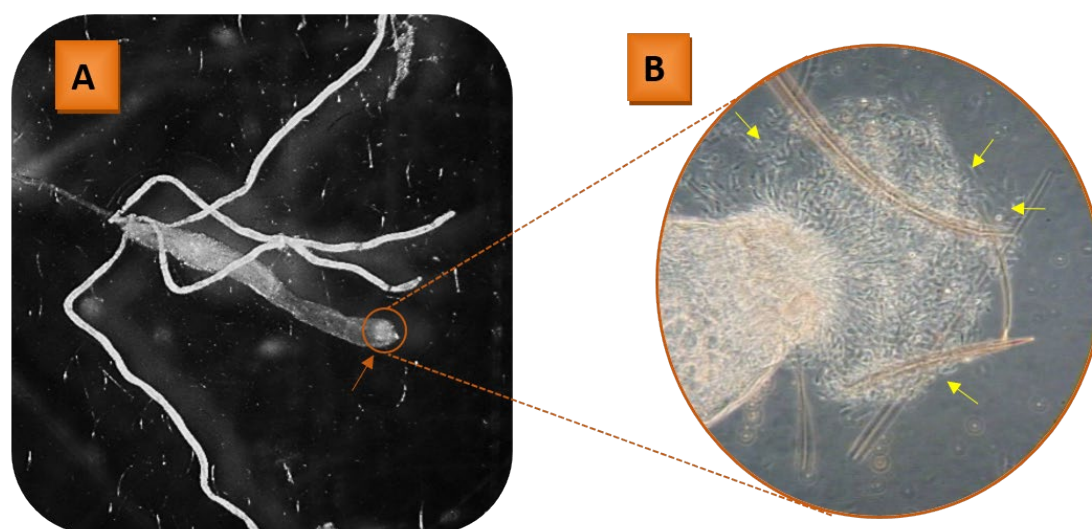
**Tabla 1. Resumen de flebotomos recolectados en los muestreos realizados por el LEM 2012-2022. Número de hembras disecadas y aislados de *L. infantum* caracterizados.**

Brote de fuenlabrada	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Pp	Sm	Total	
Trampas adhesivas	6053	2772	5553	3076	6840	4329	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18446	10177	28623
% ♀ capturadas	10	40,1	9	43,4	10,2	43,2																		9,7	42,2	26
Trampas luminosas	8044	446	3469	308	4037	196	3823	452	1433	81	978	149	1187	134	346	22	1416	135	1837	261	943	200	27513	2384	29897	
% ♀ capturadas	53,4	32	39,9	49,7	42,6	25	46,3	46,9	57,1	44,4	41,2	56,4	43,3	59	36,7	54,5	39,8	54,8	35,4	38,3	22,8	40	41,7	45,5	43,6	
Total	14097	3218	9022	3384	10877	4525	1770	212	1433	81	978	149	1187	134	346	22	1416	135	1837	231	943	200	45959	12561	58820	
♀ Disecadas	736	54	864	125	1604	42	1770	212	754	38	401	42	488	79	116	12	364	51	348	81	209	79	7654	815	8469	
♀ Positivas	19	0	57	0	41	0	34	0	21	0	5	0	5	0	3	0	0	0	2	2	5	1	192	3	195	
♀ Infectadas	2,6	1,9	6,6	0	2,6	0	1,9	0	2,8	0	1,2	0	1	0	2,6	0	0	0,6	2,5	2,4	2,4	1,3	2,5	0,5	2,3	
Cepas de <i>L. infantum</i> caracterizadas	14	0	44	0	9	0	15	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	82	0	82

Pp: *Phlebotomus perniciosus* y Sm: *Sergentomyia minuta*.

Por otro lado, se realizaron las disecciones de un total de  $n=7.654$  ♀ de *P. perniciosus*, capturadas mediante trampas CDC en las cuatro estaciones de muestreo seleccionadas ([Figura 9](#)) encontrándose un total de 192 ♀ positivas (2,5%) de las cuales 19 ♀ infectadas en 2012 (2,6%), 57 (6,6%) en 2013, 41 (2,6%) en 2014, 34 (1,9%) en 2015, 21 (2,8%) en 2016, 5 (1,2%) en 2017, 5 (1%) en 2018, 3 (2,6%) en 2019, 0 (0%) en 2020, 2 (0,6%) en 2021 y 5 (2,4%) en 2022 ([Tabla 1](#)). La evolución de las tasas de infección en relación con el número de casos de leishmaniasis humana, que hasta la fecha se sitúa en 782, se muestra en la [Figura 10](#).

**Figura 11. A. Tubo digestivo de *P. perniciosus* infectado con promastigotes de *Leishmania* sp. con detalle de la válvula estomodeal; B. Ampliación de la válvula estomodeal donde se pueden observar los promastigotes de *Leishmania* sp. (Fuente: LEM, CNM).**



Entre 2012 y 2015 se observaron promastigotes de *Leishmania* sp. en las disecciones realizadas a 151 ♀ de *P. perniciosus* capturadas en las 4 estaciones de muestreo ([Tabla 1](#) y [Figuras 7, 11A y 11B](#)). Los promastigotes se inocularon inicialmente en medio M-199. Posteriormente, aquellos cultivos que progresaron en este medio,  $n=82$ , fueron cultivados en masa en medio RPMI.

El cultivo en masa de los promastigotes de los 82 aislados permitió contar con el material suficiente para la extracción de su ADN y así realizar la amplificación y posterior estudio de las secuencias de las regiones transcritas internas, ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales ([11](#)). En la [Tabla 2](#) se muestra el número de aislados de *Leishmania* sp. caracterizados por estación de muestreo y año. Todas las secuencias obtenidas fueron idénticas a las de los aislados de *L. infantum* procedentes de liebres, conejos y humanos de la zona del brote pertenecientes todas ellas al genotipo

«Lombardi» (4,5,11,14). Se ha constatado la presencia de este mismo genotipo en liebres y conejos de la zona mediante estudios de xenodiagnóstico directo (4,5) y en hembras de *P. perniciosus* analizadas mediante métodos moleculares, con la excepción de una hembra capturada en 2020 en la estación de muestreo situada en Leganés (POL), en la que se pudo identificar *L. infantum* genotipo «A», genotipo responsable de casos de LV y LC en otras zonas de la CM (14).

**Tabla 2. Aislados de *Leishmania* sp. caracterizados por estación de muestreo y por año.**

AÑO/ ESTACIONES	ATE	BOS	POL	JIC	TOTAL	Total caracterizados
2012	5	4	7	3	19	14
2013	2	20	19	16	57	44
2014	3	16	1	21	41	9
2015	6	17	4	3	30	15
Total	16	57	31	43	147	82

En lo que se refiere a la virulencia de *L. infantum* genotipo «Lombardi», esta se ha podido demostrar mediante un modelo natural de transmisión de leishmaniasis visceral en hámsteres en el que se utilizaron hembras de *P. perniciosus*, procedentes de la colonia del LEM, infectadas experimentalmente con dos de los aislados obtenidos mediante disección de hembras de *P. perniciosus* capturadas en la zona del brote (15). Así mismo los trabajos de caracterización de la virulencia de estos aislados, en un modelo *ex vivo* (16) y en otro modelo experimental *in vivo* utilizando ratones (17), han podido confirmar la elevada virulencia de los mismos. Por otro lado, se ha podido demostrar también que estos aislados presentan una baja capacidad de infectar células caninas *in vitro* (18). Esto, junto a una mayor protección de los perros, daría respuesta a la baja seroprevalencia de leishmaniasis canina encontrada en los perros de la zona (19).

Por otra parte, durante la realización de las disecciones de las hembras de *P. perniciosus* capturadas se pudo observar una elevada densidad de parásitos en el tubo digestivo de las infectadas (Figura 11A y 11B). Hay que destacar que las altas cargas de parásitos en el intestino medio de los flebotomos se han correlacionado con un patrón de alimentación persistente que conduce a un aumento en la transmisión de *Leishmania* (20). Por lo tanto y con la finalidad de poder establecer la carga parasitaria, se realizó una PCR en tiempo real (qPCR) a partir del ADN obtenido de n=68♀ de *P. perniciosus* en las que se había detectado previamente *L. infantum* mediante PCR convencional. El 70% de las hembras analizadas en este estudio presentaron un número significativo de parásitos en sus tubos digestivos, con infecciones superiores

a 10.000 parásitos/reacción en el 16,2%, llegando a situarse la carga parasitaria en un ejemplar en los 100.000 parásitos/reacción (21).

Por otro lado, en la última década, desde 2012-2022, se estudiaron por métodos moleculares un total de  $n=1375$  ♀ de *P. perniciosus* capturadas mediante trampas de luz y trampas adhesivas en la zona del brote (Figura 9). Se realizó la detección molecular de *L. infantum* en  $n=814$  ♀ de *P. perniciosus*, capturadas sin sangre en sus estómagos, y se detectó *L. infantum* en  $n=56$  (6,9%).

El estudio de las preferencias alimentarias y detección de *L. infantum* por métodos moleculares se realizó en un total de  $n=561$  ♀ de *P. perniciosus* capturadas en la zona del brote que presentaban sangre en sus tubos digestivos. El análisis molecular de la sangre ingerida por  $n=437$  ♀ de *P. perniciosus* del brote mostró que el 75,9% era sangre de conejo (7,8% infectadas por *L. infantum*), el 18,3% de liebre (21,2% infectadas por el parásito), el 3,2% de gato y el 1,1% de sangre humana. Así mismo, se identificó sangre de perro ( $n=1$ ), caballo ( $n=1$ ), hurón ( $n=1$ ) y gallo ( $n=1$ ) en  $n=4$  ♀ de *P. perniciosus*, representando un 0,2% en cada una de ellas. Además, se identificó una alimentación mixta en  $n=2$  ♀ de *P. perniciosus*. Todos estos resultados sugieren un carácter oportunista de las hembras de *P. perniciosus* en cuanto a sus preferencias alimentarias. La tasa de infección por *L. infantum* en las  $n=124$  ♀ de *P. perniciosus* en las que no se logró identificar la sangre (22,1%) se situó en el 12,1%.

Por otra parte, las observaciones realizadas de formas compatibles con *Trypanosoma* sp. en las hembras de *P. perniciosus* durante los ensayos de xenodiagnóstico llevados a cabo en conejos capturados en la zona del brote (5) motivó el estudio de  $n=155$  ♀ de *P. perniciosus* en las que se detectó sangre de conejo en su tubo digestivo siendo  $n=15$  (9,7%) positivas a *L. infantum*. En conclusión, se pudo describir por primera vez la presencia de *Trypanosoma nabiasi* en  $n=20$  (12,9%) hembras de *P. perniciosus* capturadas en la zona del brote que se habían alimentado de sangre de conejo. Además, se pudo detectar la coinfección de *L. infantum*/*T. nabiasi*, en  $n=1$  ♀ de *P. perniciosus* (22).

### Muestreos con trampas CDC realizados en una vivienda del barrio «El Naranjo» en el municipio de Fuenlabrada

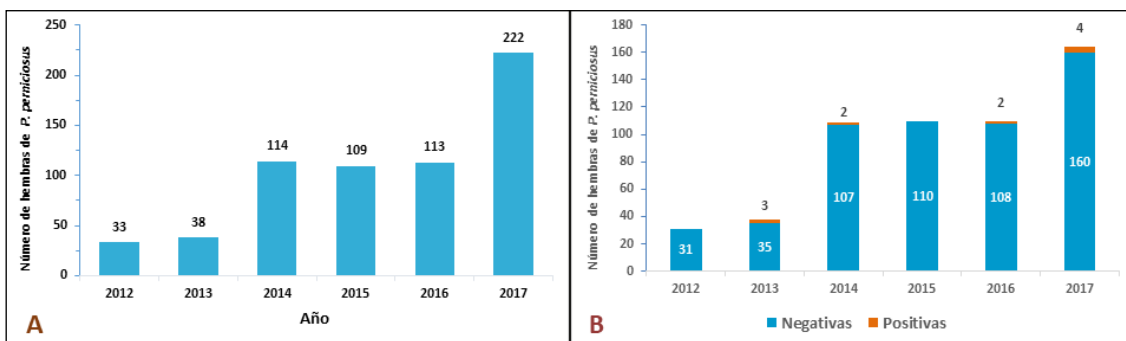
Desde el año 2012 hasta el 2017, se realizaron muestreos con trampas CDC en la parte exterior de una vivienda situada en el barrio de «El Naranjo». En algunos casos la trampa CDC se colocó en el interior de la vivienda (aseo y comedor). En la Figura 12A se muestra la localización de la vivienda en el barrio «El Naranjo» y en la Figura 12B y C un detalle de la trampa de luz colocada en la fachada de la primera planta de la vivienda.

**Figura 12. A. Localización de la vivienda en el barrio «El Naranjo» que bordea el parque; B y C. Detalle de la trampa de luz colocada en la zona de tendederos de la primera planta de la vivienda (Fuente: LEM, CNM).**



El número total de hembras de *P. perniciosus* capturadas se situó en n=629 y el de machos en n=92. En cuanto al número de hembras capturadas en el interior de la vivienda fue de n=32 en 2012, n=5 en 2013, n=14 en 2016 y n=3 en 2017 (Figura 13A). Se realizaron las disecciones de n=562♀ de flebotomo, encontrándose un total de 11 de ellas positivas (1,95%), siendo el porcentaje de hembras infectadas por año del 8,5% en 2013, 1,8% en 2014 y 2016 y 2,5% en 2017 (Figura 13B). Todas las hembras positivas se capturaron en el exterior de la vivienda.

**Figura 13. A. Número de hembras de *P. perniciosus* capturadas por año en el exterior de una vivienda situada en el barrio de «El Naranjo», Fuenlabrada. B. Número de hembras de *P. perniciosus* positivas a *L. infantum* por disección y por año de muestreo.**



Por otro lado, se realizó la detección molecular de *L. infantum* en un total de n=23♀ capturadas, en 2016 (n=4) de las cuales n=3 presentaban sangre en su tubo digestivo y, en 2017 (n=19), de las cuales n=3 presentaban sangre en el tubo digestivo. Se pudo detectar *L. infantum* genotipo «Lombardi» en una hembra de *P. perniciosus* capturada en el exterior de la vivienda en 2017. En cuanto al estudio de las preferencias alimentarias se encontró sangre de origen humano en 3♀ de *P.*

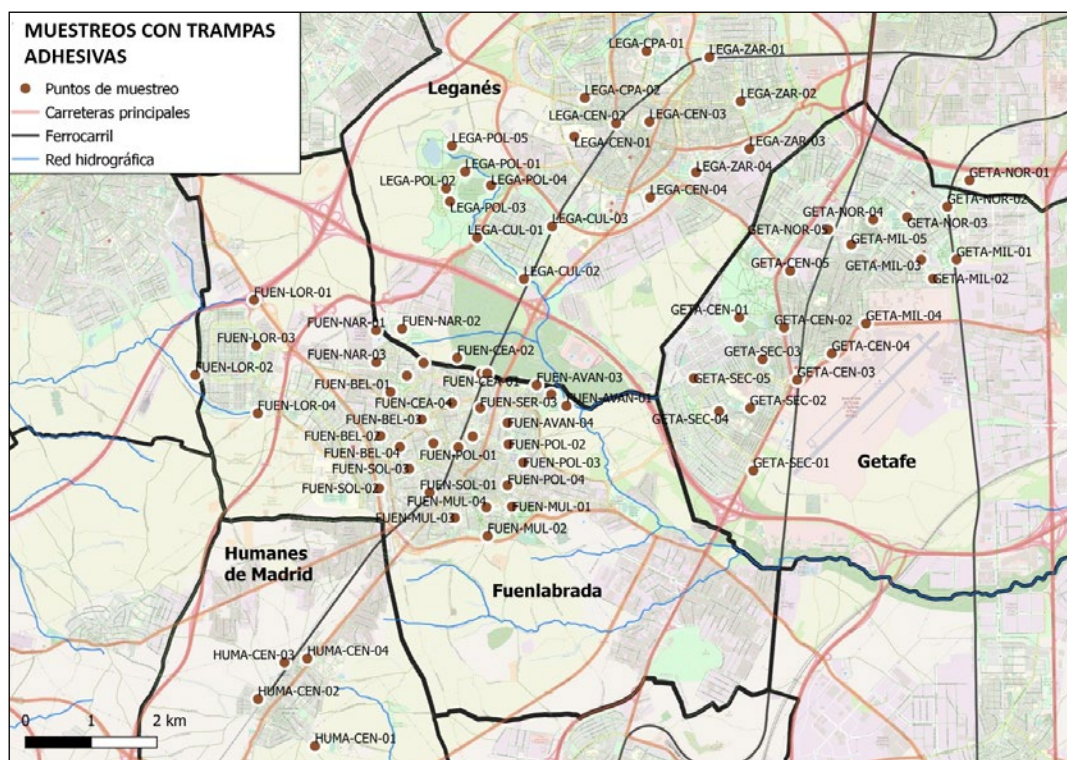
*perniciosa* capturadas en el interior de la vivienda en 2016 y en 2 ♀ capturadas en 2017. Además, se detectó sangre de conejo en 1 ♀ de *P. perniciosus* capturada en la fachada de la vivienda.

### Otros muestreos entomológicos realizados en colaboración con la Comunidad de Madrid en los municipios afectados por el brote

Muestreos de flebotomos y estudios moleculares realizados con trampas adhesivas y luminosas en la zona del brote

Estos muestreos son realizados por los Técnicos de los Ayuntamientos de los diferentes municipios, en casi su totalidad, con trampas adhesivas. Se seleccionaron 4 estaciones de muestreo en Humanes de Madrid, 18 en Leganés, 20 en Getafe y 29 en Fuenlabrada (Figura 14). Las trampas adhesivas son examinadas en la Facultad de Ciencias Biológicas, UCM y se envían hembras de flebotomos al LEM para la identificación de la sangre ingerida por las mismas y llevar a cabo la detección de *Leishmania* sp., mediante métodos moleculares.

**Figura 14. Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico con trampas adhesivas y localización de las estaciones de muestreo en los municipios de Fuenlabrada, Getafe, Leganés y Humanes de Madrid. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



Desde 2012 a 2022 se estudiaron un total de  $n=2210$  ♀ de *P. perniciosus*. En la [Tabla 3](#) se muestra el total de hembras analizadas y el número de hembras positivas, en las que se detectó *L. infantum*, en cada uno de los municipios donde se realizaron los muestreos. Del total de hembras analizadas,  $n=1210$  contenían sangre en su tubo digestivo, de las cuales fueron positivas a *L. infantum*  $n=137$  (11,3%). Así mismo, se estudiaron  $n=1000$  ♀ de *P. perniciosus* sin sangre y se pudo detectar *L. infantum* en  $n=20$  (2%) de ellas.

**Tabla 3. Número total de hembras de *P. perniciosus* analizadas y número de positivas en cada uno de los municipios estudiados.**

MUNICIPIO	N.º de <i>P. perniciosus</i> analizadas	N.º ♀ <i>P. perniciosus</i> positivas <i>L. infantum</i> (%)
Leganés	930	131 (14)
Fuenlabrada	939	20 (2,15)
Getafe	329	5 (1,52)
HUmanes de Madrid	12	1 (8,33)
TOTAL	2210	157 (7,1)

En cuanto al análisis de las preferencias alimentarias de las  $n=1210$  ♀ de *P. perniciosus* con sangre se logró identificar el origen de la sangre ingerida en  $n=964$  ♀ (79,7%). De las  $n=964$  ♀ con sangre estudiadas el 55,6% presentaron sangre de liebre (18,5% infectadas) y el 28,7% sangre de conejo (5,1% infectados). Se identificó además la sangre de 6 especies de mamíferos y 3 de aves, y se detectaron 5 ingestiones mixtas, confirmándose el carácter oportunista en relación con los hábitos alimenticios de *P. perniciosus* ([23](#)).

Por otra parte, hay que destacar el estudio molecular de  $n=377$  ♀ de *S. minuta* capturadas en los cuatro municipios afectados por el brote ([Figura 14](#)). El análisis de la sangre ingerida en  $n=310$  ♀ de *S. minuta*, con sangre en el tubo digestivo, ha revelado que sus preferencias alimentarias no solo se limitan a los reptiles, sino que se extienden también a mamíferos, incluidos los humanos. Se identificó sangre de mamífero en  $n=23$  ♀ (*Homo sapiens*,  $n=18$ ; *Oryctolagus cuniculus*,  $n=2$ ; *Lepus granatensis*,  $n=2$  y *Bos taurus*,  $n=1$ ), lo que denota un cierto carácter antropofílico de *S. minuta*. Así mismo, se pudo detectar *Leishmania* sp. relacionada con las especies encontradas en reptiles en hembras de *P. perniciosus* alimentadas con sangre humana ([24](#)). Excepcionalmente se ha podido detectar *Leishmania* sp., similar a la hallada en *S. minuta*, en una hembra de *P. perniciosus* capturada en 2018 en un punto de muestreo del Parque Polvoranca (Leganés). Los hallazgos obtenidos en nuestro trabajo no aportan ninguna evidencia por ahora de la posible patogenicidad de la *Leishmania* sp. detectada en las *S. minuta* capturadas en la zona del brote de leishmaniasis del suroeste de la CM ([24](#)).

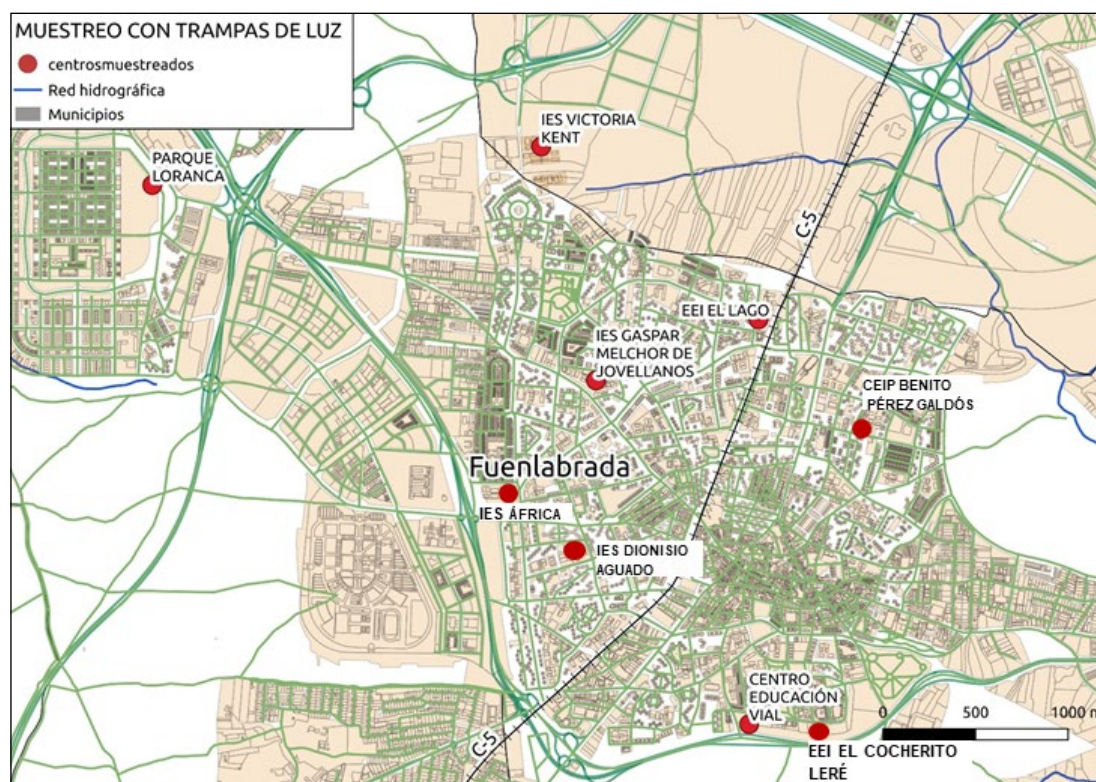
## Muestreos de flebotomos y estudios moleculares realizados con trampas luminosas en la zona del brote

Estos muestreos, como se indicó anteriormente, fueron realizados por Técnicos de la Subdirección General de Sanidad Ambiental de la CM en los municipios de Fuenlabrada y Getafe.

### Municipio de Fuenlabrada

En septiembre de 2018 se colocaron 8 trampas de luz en el municipio de Fuenlabrada en 5 estaciones de muestreo: IES Jovellanos, Parque Loranca, Centro de Educación Vial, Escuela de Educación Infantil El Lago e IES Victoria Kent. Por otro lado, en octubre de 2019 se colocaron 3 trampas CDC en IES Jovellanos, IES Dionisio Aguado y en la Escuela de Educación Infantil «El Cocherito Lere». Y por último en octubre de 2020 se colocaron 6 trampas CDC (2 trampas en cada punto de muestreo) en las estaciones de IES Lago, IES África, CEIP Benito Pérez Galdós. Todos los puntos muestreados se recogen en la [Figura 15](#).

**Figura 15. Estaciones de muestreo seleccionadas en el municipio de Fuenlabrada. Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico y localización de las estaciones de muestreo. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



La [Tabla 4](#) muestra los resultados de los muestreos realizados en la zona urbana del municipio de Fuenlabrada. Hay que subrayar la detección de *L. infantum* genotipo «Lombardi» en n=4♀ de *P. perniciosus* capturadas en la estación de muestreo IES Gaspar Melchor de Jovellanos y en n=1♀ de *P. perniciosus* capturada en EEI Lago en 2018.

**Tabla 4. Número de hembras de *P. perniciosus* estudiadas mediante métodos moleculares por estación y año de muestreo.**

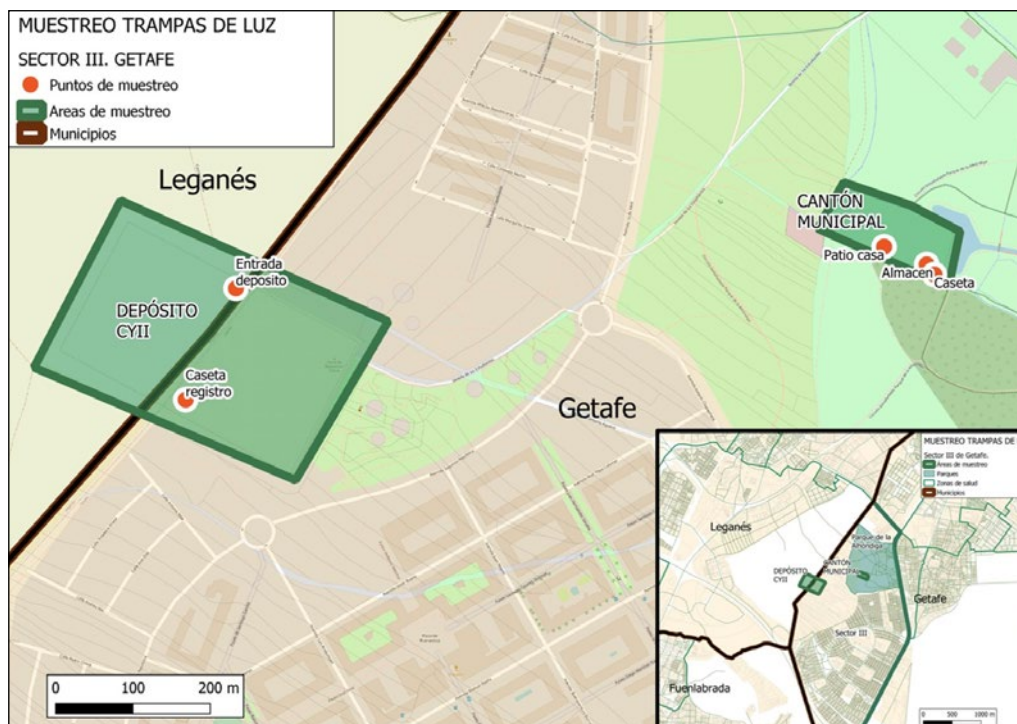
Estación de muestreo	N.º de ♀ de <i>P. perniciosus</i> analizadas / N.º de ♀ positivas (%)			
	2018	2019	2020	Total
IES Gaspar Melchor de Jovellanos	150/4* (2,66)	21		171/4* (2,33)
Parque Loranca	3	-	-	3
Centro de Educación Vial	14	-	-	14
EEI El Lago	79/1* (1,26)	-	1	80/1* (1,25)
IES Victoria Kent	56	-	-	56
IES Dionisio Aguado	-	3	-	3
EEI Cocherito Leré	-	2	-	2
IES África	-	-	2	2
CEIP Benito Pérez Galdós	-	-	2	2
TOTAL	302/5* (1,65)	26	5	333/5* (1,50)

\**Leishmania infantum* genotipo «Lombardi».

### Municipio de Getafe

En septiembre de 2021 se colocaron trampas de luz tipo CDC en dos puntos de muestreo situados en la estación del Depósito del Canal de Isabel II y en tres puntos del Parque de la Alhóndiga (Cantón Municipal). Por otro lado, en julio de 2022 se colocaron tres trampas CDC en el Parque de la Alhóndiga, en las estaciones de muestreo, Caseta, Almacén y Patio Casa ([Figura 16](#)).

**Figura 16. Estaciones de muestreo en el municipio de Getafe. Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico con la localización de las estaciones de muestreo. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



Se capturaron en total  $n=1286$  flebotomos en los puntos de muestreo seleccionados, de los cuales  $n=340$  fueron hembras y  $n=946$  machos (Tabla 5), estos últimos fueron clasificados taxonómicamente y las hembras se estudiaron por métodos moleculares.

En cuanto al estudio molecular de las  $n=340$  ♀ de flebotomos, capturadas con trampas CDC en Getafe en 2021, es importante destacar el número de hembras de *P. perniciosus* infectadas en la estación de muestreo Cantón Municipal Parque Alhóndiga y más concretamente en el punto de muestreo Caseta ( $n=9$ , 13,2%), con la presencia de *L. infantum* genotipo «Lombardi», confirmado en 3 de las hembras. No se consiguió determinar el genotipo de *L. infantum* en las  $n=6$  ♀ restantes. Además, fue posible la identificación de sangre humana en una de las hembras infectadas. Por otro lado, hay que señalar la presencia de sangre de conejo y sangre de gato en  $n=3$  y  $n=1$  hembras, respectivamente capturadas en el punto de muestreo identificado como Patio Casa. En el punto de muestreo denominado Almacén, se pudo detectar sangre de conejo en  $n=5$  ♀ de *P. perniciosus* y sangre de gato en  $n=1$  ♀ de *P. perniciosus*. Con respecto a las hembras estudiadas en la estación de muestreo Canal de Isabel II todas resultaron negativas a *L. infantum*. Se ha podido identificar sangre de conejo en  $n=8$  ♀.

**Tabla 5. Número total de flebotomos capturados y número de hembras de *P. perniciosus* positivas en el muestreo realizado en Getafe en 2021.**

Estaciones de muestreo		♂		♀		Total
		Sm	Pp	Sm	Pp	
Depósito Canal de Isabel II	Entrada depósito	0	26	3	35	64
		26		38		
	Caseta registro	4	24	15	15	58
		28		30		
	Caseta	14	232	0	68/9* (13,2%)	315
		246		69		
Cantón municipal	Almacén	13	406	9	133	561
		419		142		
	Patio casa	9	218	3	59	289
		227		62		
TOTAL		40	906	30	310	1286
		946		340		

\* n=3 *Leishmania infantum* genotipo Lombardi.

En julio de 2022 únicamente se realizaron muestreos en el Cantón Municipal. Se capturaron un total de 39♀ de flebotomos, realizándose la disección en 14♀ de *P. perniciosus* que resultaron negativas. En cuanto a las 25♀ restantes (16 *P. perniciosus* y 9 *S. minuta*), analizadas por métodos moleculares, también fueron negativas. Hay que destacar la presencia de sangre de conejo en el tubo digestivo de una hembra de *P. perniciosus* capturada en el punto de muestreo denominado Almacén.

### Muestreos entomológicos realizados en municipios no afectados por el brote

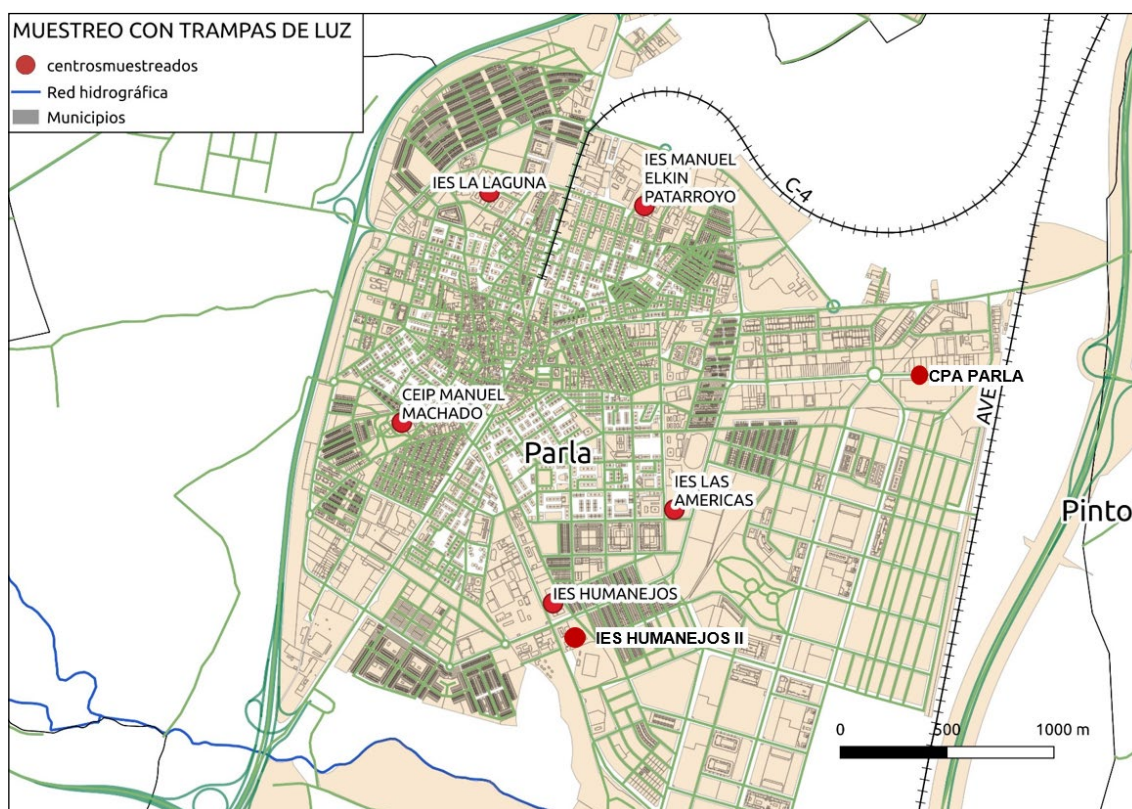
En estos trabajos, las trampas luminosas tipo CDC fueron colocadas por Técnicos de la Subdirección General de Sanidad Ambiental de la CM en los diferentes municipios. El LEM colaboró en los muestreos de Móstoles y Alcorcón.

#### Municipio de Parla

Desde el año 2016 a 2021 con excepción de 2019 se colocaron trampas de tipo CDC en un total de 7 puntos de muestreo del municipio de Parla (Figura 17). En septiembre de 2017 se realizaron los muestreos con trampas CDC en los IES de

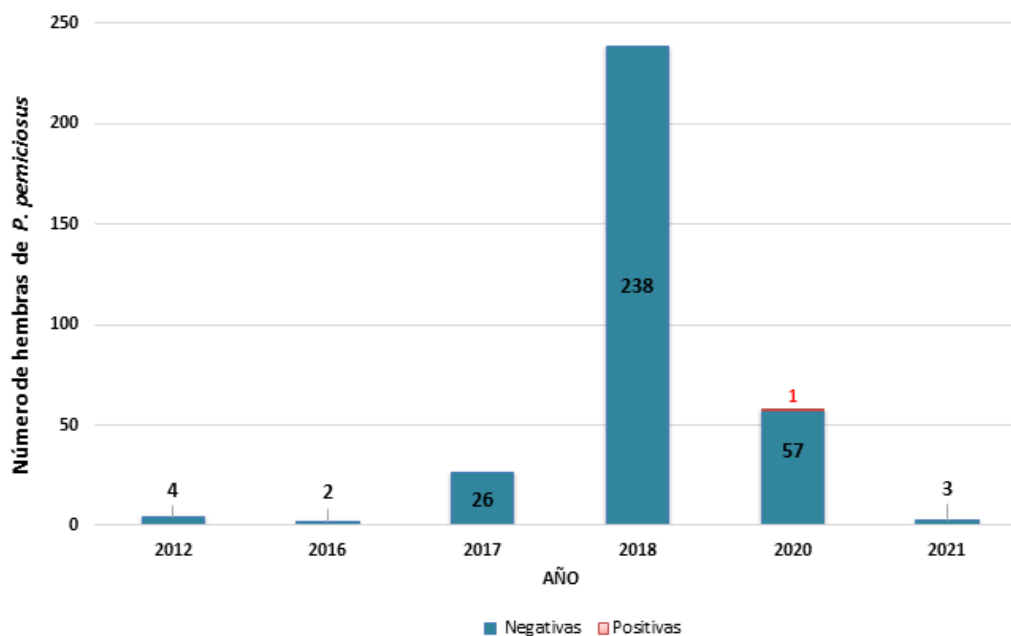
Humanejos y La Laguna y en septiembre de 2018 se colocaron trampas CDC en el IES Las Américas, en el Centro de Educación Infantil y Primaria Antonio Machado, y en los IES La Laguna, Elkin Patarroyo y Humanejos I y II. En septiembre de 2020 también se colocaron trampas en las estaciones IES Humanejos I y II, CPA Parla e IES La Laguna, y en julio de 2021 en el IES Humanejos y el CPA Parla.

**Figura 17. Estaciones de muestreo en el municipio de Parla. Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico y localización de las estaciones de muestreo.**  
Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).



En total se analizaron un total de  $n=327$  ♀ de *P. perniciosus* mediante métodos moleculares a lo largo de los 5 años de muestreo. En la [Figura 18](#) se muestra el número de hembras de *P. perniciosus* estudiadas por año de muestreo. Es de destacar la detección de *L. infantum* genotipo «Lombardi» en una hembra de *P. perniciosus* capturada en 2020 en la estación de muestreo correspondiente al IES Humanejos ([Figura 17](#)).

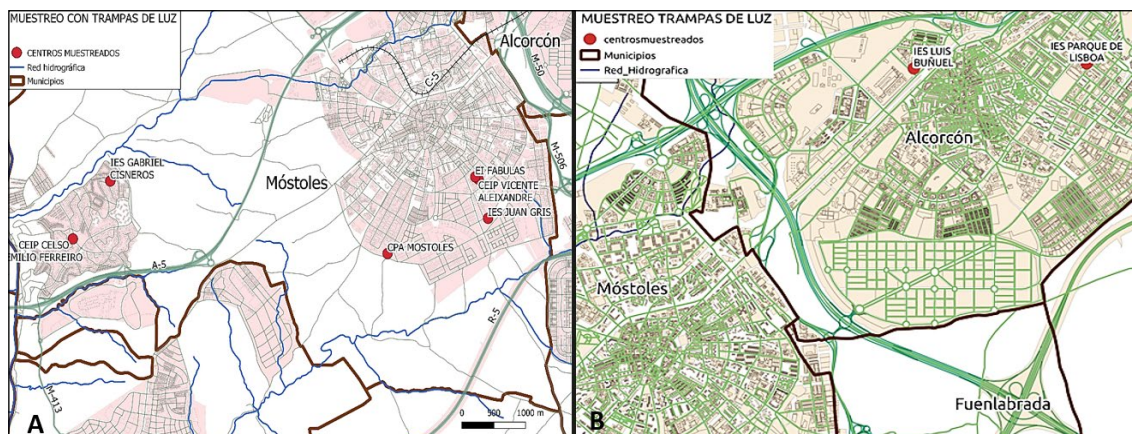
**Figura 18. Hembras de *P. perniciosus* estudiadas por métodos moleculares en cada año de muestreo en el municipio de Parla.**



### *Municipios de Móstoles y Alcorcón*

En el mes de septiembre de 2019 se realizaron capturas con trampas de Luz tipo CDC en los municipios de Alcorcón y de Móstoles. En Alcorcón se seleccionaron dos puntos de muestreo en los IES Luis Buñuel y Parque de Lisboa ([Figura 19B](#)) en cada punto de muestreo se colocó una trampa tipo CDC. En el municipio de Móstoles se seleccionaron dos puntos de muestreo situados en los IES Manuel de Falla y Juan Gris. En 2020 y en julio de 2021 solo se realizaron muestreos en el municipio de Móstoles, colocándose una trampa CDC en cada una de las siguientes estaciones de muestreo: Centro de Educación Infantil y Primaria (CEIP) Celso Emilio Ferreiro (Parque Coímbra) y en el IES Juan Gris, ambas en el municipio de Móstoles ([Figura 19A](#)).

**Figura 19. Estaciones de muestreo en los municipios de Móstoles (A) y Alcorcón (B). Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico y localización de las estaciones de muestreo. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



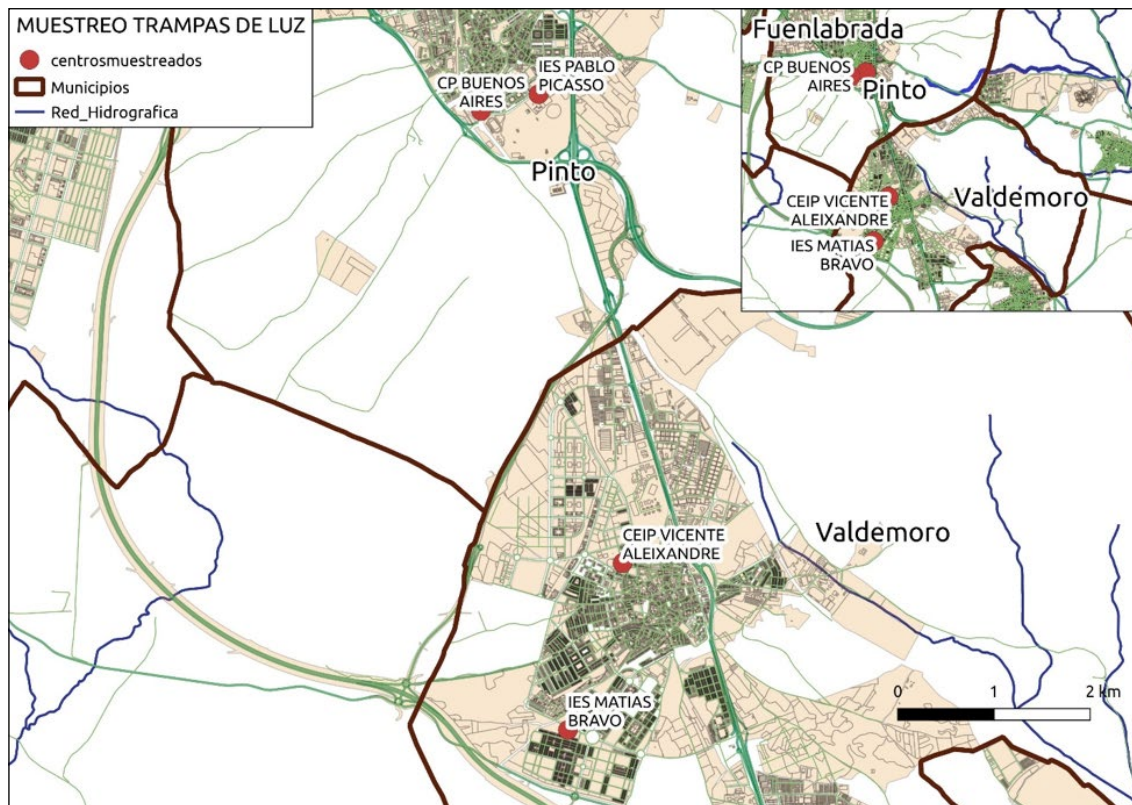
En septiembre de 2019 se capturaron  $n=5$ ♀ de *P. perniciosus* en el municipio de Alcorcón, resultando todas las disecciones negativas. Por otro lado, se realizaron las disecciones de  $n=5$ ♀ y  $n=11$ ♀ de *P. perniciosus* capturadas en el municipio de Móstoles, en los meses de septiembre de 2019 y julio de 2021, respectivamente, resultando todas negativas también. En 2020 se capturaron 72♀ de *P. perniciosus* que fueron analizadas mediante métodos moleculares. En esta ocasión, hay que destacar la detección de *L. infantum* genotipo «Lombardi» en una hembra de *P. perniciosus* capturada en el CEIP Celso Emilio Ferreiro, situado en la urbanización Parque Coímbra de Móstoles (Tabla 6).

### Municipios de Pinto y Valdemoro

Los muestreos en los municipios de Pinto y Valdemoro se realizaron en septiembre de 2019. Se colocaron trampas de luz de tipo CDC en los dos puntos de muestreo del municipio de Pinto: IES Pablo Picasso y CP Buenos Aires. Así mismo, se colocaron trampas en los puntos de muestreo IES Matías Bravo y CEIP Vicente Aleixandre del municipio de Valdemoro.

En los muestreos de flebotomos realizados en 2019 se capturaron  $n=6$ ♀ y  $n=2$ ♀ de *P. perniciosus* en Pinto y Valdemoro, respectivamente. Se analizaron mediante métodos moleculares, resultando ser todas ellas negativas (Tabla 6).

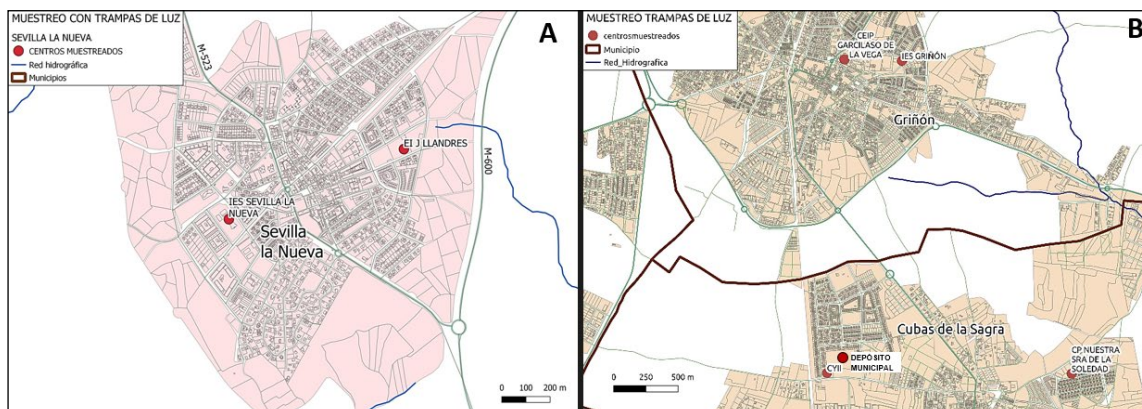
**Figura 20. Estaciones de muestreo en los municipios de Pinto y Valdemoro. Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico y localización de las estaciones de muestreo. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



### *Municipios de Sevilla la Nueva, Cubas de la Sagra y Griñón*

En el municipio de Sevilla la Nueva se seleccionaron dos puntos de muestreo en octubre de 2020, Escuela Infantil Juana Llandres e IES Sevilla La Nueva, donde se colocaron una y dos trampas CDC, respectivamente ([Figura 21A](#)). Por otro lado, en 2019 se colocaron trampas en el CEIP Nuestra Señora de la Soledad y en el Depósito del Canal de Isabel II (CYII) de Cubas de la Sagra, en octubre de 2020 solo se colocaron trampas CDC en el Depósito del CYII (una trampa) y en el Depósito Municipal (2 trampas) de este mismo municipio. En el municipio de Griñón se muestreo en 2019, en el IES Griñón y en el CEIP Garcilaso de la Vega ([Figura 21B](#)).

**Figura 21. Estaciones de muestreo en los municipios de Sevilla la Nueva (A), Cubas de la Sagra y Griñón (B). Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico y localización de las estaciones de muestreo. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



Todas las hembras de *P. perniciosus* capturadas en los muestreos llevados a cabo en los municipios de la [Figura 21](#) fueron analizadas mediante métodos moleculares. Los resultados se muestran en la [Tabla 6](#). Hay que destacar la detección de *L. infantum* genotipo «Lombardi» en n=1♀ de *P. perniciosus* capturada en el municipio de Cubas de la Sagra en 2019.

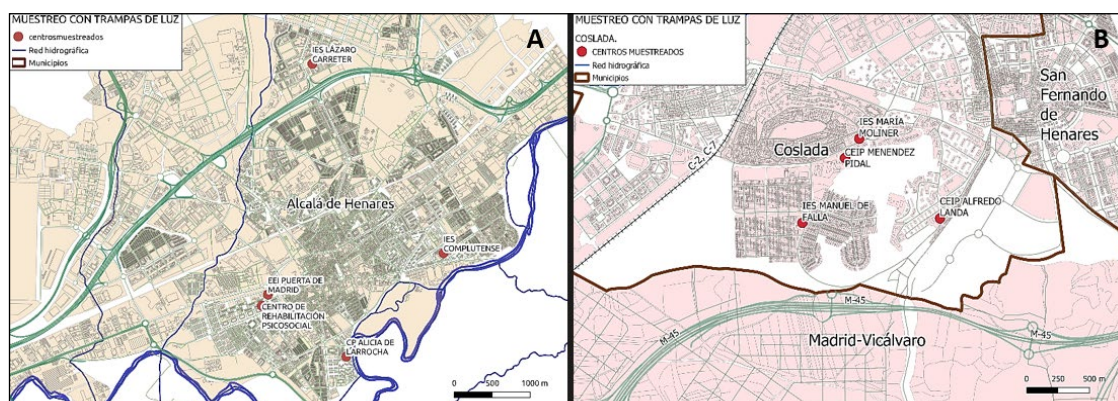
### *Municipios de Alcalá de Henares y Coslada*

En septiembre de 2019 se colocó una trampa de luz tipo CDC en cada una de las 5 estaciones de muestreo seleccionadas en el municipio de Alcalá de Henares: Escuela de Educación Infantil Puerta de Madrid, Centro de Rehabilitación Psicosocial, IES Lázaro Carreter, Colegio Público Alicia de Larrocha, IES Complutense ([Figura 22A](#)).

En la [Figura 22B](#) se muestran los 4 puntos de muestreo en el municipio de Coslada donde se colocaron trampas de tipo CDC en octubre de 2020: IES Manuel de Falla, IES María Moliner, Colegio de Educación Infantil y Primaria Menéndez Pidal y el CEIP Alfredo Landa. En todas las estaciones se colocaron 2 trampas de tipo CDC con excepción del CEIP Alfredo Landa donde únicamente se colocó una.

En total se capturaron n=12♀ de flebotomos en las 5 estaciones de muestreo de Alcalá de Henares: 4♀ y 5♂ de *P. perniciosus* y por otro lado 2♀ y 1♂ de *S. minuta*, repartidos en las estaciones de Puerta de Madrid, Lázaro Carreter y La Rocha, no se capturó ningún ejemplar en las otras dos estaciones. Se realizaron las disecciones de las hembras resultando todas negativas.

**Figura 22. Estaciones de muestreo en los municipios de Alcalá de Henares (A) y Municipio de Coslada (B). Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico y localización de las estaciones de muestreo. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



En la [Tabla 6](#) se muestran el resumen de los resultados obtenidos correspondientes a la detección molecular de *L. infantum* realizada en las hembras de *P. perniciosus* capturadas en las estaciones de muestreo seleccionadas en los diferentes municipios de la CM ([Figuras 1](#), [17](#), [19](#), [20](#), [21](#) y [22](#)) con la excepción del municipio de Parla. Hay que destacar la detección de *L. infantum* genotipo «Lombardi» en  $n=2♀$  de *P. perniciosus* capturadas en los municipios de Cubas de la Sagra y Móstoles en 2019 y 2020, respectivamente.

**Tabla 6. Resultados del análisis molecular realizado en las hembras de *P. perniciosus* capturadas en los diferentes municipios muestreados.**

Municipio	N.º de ♀ de <i>P. perniciosus</i> analizados (N.º positivas)/Año			
	2019	2020	2021	Total
Móstoles	-	75 (1*)	-	75 (1*)
Alcorcón	-	-	-	-
Sevilla la Nueva	-	9 (0)	-	9
Cubas de la Sagra	34 (1*)	3 (0)	4 (0)	41 (1*)
Coslada	-	2 (0)	-	2
Alcalá de Henares	-	-	-	-
Pinto	6 (0)	-	-	6
Valdemoro	2 (0)	-	-	2
Griñón	4 (0)	-	-	4
Total	46 (1*)	89 (1*)	4 (0)	139 (2*)

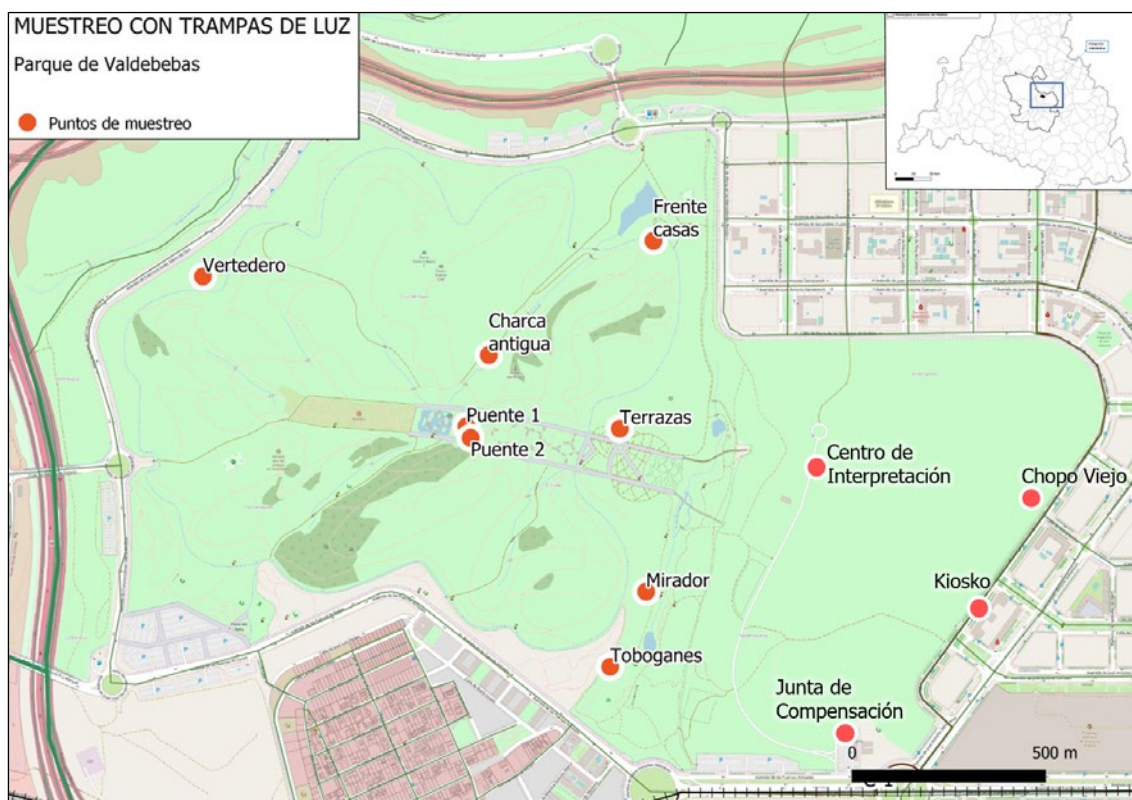
\**Leishmania infantum* genotipo «Lombardi».

### Muestreos entomológicos en otras áreas de interés del municipio Madrid

Durante los últimos años, la vigilancia entomológica se ha ido ampliando a otras zonas como el Parque Forestal de Valdebebas, al noreste del municipio de Madrid.

En septiembre de 2016 y julio, agosto y septiembre de 2017, 2021 y 2022 se llevaron a cabo muestreos entomológicos con trampas CDC en dicho parque. Se seleccionaron inicialmente 6 estaciones de muestreo situadas en el interior del parque colocando en cada una de ellas una trampa de luz tipo CDC. El número de estaciones se incrementó a 8 en el verano de 2021 y a 12 en 2022 (Figura 23).

**Figura 23. Localización de las estaciones de muestreo en el Parque Forestal de Valdebebas donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico. Fuente: QGIS versión 3.10.10 (<https://qgis.org>).**



En los cuatro años en los que se han llevado a cabo los muestreos en el Parque Forestal de Valdebebas se ha capturado un total de  $n=1132$  flebotomos ( $n=774$  *P. perniciosus* y  $n=358$  *S. minuta*). Se efectuaron disecciones de 238 ♀ de *P. perniciosus*. Por otro lado, se realizó la detección de *L. infantum* y la identificación de la sangre ingerida por las hembras capturadas con sangre en su tubo digestivo. Como hallazgo

destacable cabe mencionar que se ha podido detectar *L. infantum* genotipo «Lombardi» y *L. infantum* genotipo A en algunas de las hembras de *P. perniciosus* capturadas.

Estos resultados han sido presentados en el Congreso de la SOCEPA celebrado en Madrid en 2022 (25) y serán próximamente publicados en una revista indexada.

## CONCLUSIONES

- *Phlebotomus perniciosus* es la especie responsable de la transmisión de *Leishmania infantum* en los municipios afectados por el brote, presente en altas densidades, en otros términos municipales de la Comunidad de Madrid y en otras áreas del municipio de Madrid.
- Las tasas de hembras de *P. perniciosus* infectadas en la zona son muy elevadas situándose en los últimos 12 años en el 2%, en promedio.
- Las elevadas densidades de promastigotes de *L. infantum* observadas tras la disección de los tubos digestivos de las hembras infectadas se han visto corroboradas mediante PCR en tiempo real (qPCR).
- El análisis del origen de la sangre ingerida por las hembras de *P. perniciosus*, junto con el hallazgo de hembras de este vector altamente infectadas, confirma la estrecha asociación entre flebotomos, liebres y conejos en el parque Bosquesur, erigiéndose estos lepóridos en la fuente de alimentación principal de las hembras. Se confirma también el carácter oportunista de *P. perniciosus* en cuanto a hábitos alimenticios se refiere, pues se han detectado otras fuentes de alimentación de sangre.
- Se confirma la omnipresencia de *L. infantum* genotipo «Lombardi» en las hembras de *P. perniciosus* capturadas en los municipios afectados por el brote, así como en otros municipios como Parla, Cubas de la Sagra y Móstoles. Así mismo, se ha detectado este genotipo en hembras de *P. perniciosus* capturadas en un área del municipio de Madrid, como es el Parque Forestal de Valdebebas.
- Las cepas de *L. infantum* genotipo «Lombardi» aisladas de *P. perniciosus* capturados en la zona del brote muestran una acusada virulencia.
- El análisis de la sangre ingerida por hembras de *S. minuta* ha revelado que sus preferencias alimentarias no solo se circunscriben a los reptiles, sino que incluyen también algunos mamíferos, entre los que destaca el ser humano.
- Se ha detectado la presencia de *Trypanosoma nabiasi* en hembras de *P. perniciosus* capturadas en la zona del brote alimentadas de sangre de conejo.

Incluso se ha detectado la coinfección de *L. infantum*/*T. nabiasi* en una hembra de *P. perniciosus*.

- Los trabajos realizados evidencian la existencia de un ciclo silvestre de transmisión de *L. infantum* muy intenso en la zona del brote de leishmaniasis de Fuenlabrada, con el hallazgo de liebres y conejos como nuevos, y prácticamente únicos, reservorios de la enfermedad para la ciencia. Todo ello ha provocado la urbanización de la leishmaniasis en la zona y la aparición de un importantísimo brote comunitario de leishmaniasis en humanos, el más importante jamás detectado con anterioridad en Europa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Thompson RCA. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology*. 2013; 43:1079-1088.
2. World Health Organization (2022). Operational manual on leishmaniasis vector control, surveillance, monitoring and evaluation. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Conesa Gallego E, Romera Lozano E, Martínez Ortega E. Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Comunidad de Madrid (España). *Anales de Biología*. 1999; 22 (Biología animal, 11) (1997): 43-50.
4. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol*. 2012; 190: 268-271.
5. 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.
6. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid. N.º 9. Volumen 28. Septiembre 2023. Consejería de Sanidad. Dirección General de Salud Pública <http://www.comunidad.madrid/servicios/salud/boletin-epidemiologico>
7. Brote de Leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Edita: Consejería de Sanidad. Dirección General de Salud Pública. Comunidad de Madrid. <https://www.comunidad.madrid/publicamadrid>.
8. Molina R, Moreno J, Jiménez M, Nieto J, Carrillo E, Chicharro C. 2022. Programa de vigilancia de leishmaniasis humana en el Area-9 de la Comunidad

- Autónoma de Madrid. En: Programas de Vigilancia Microbiológica del Centro Nacional de Microbiología (JE Echevarría Mayo & J Oteo Iglesias, eds.). Edita: Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III – Ministerio de Ciencia e Innovación. Editorial MIC. N.I.P.O. e-pub: 834210318.
9. Dolmatova A, Demina N. Les phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent, en: Étude anatomique et physiologique des Phlebotominae ailés. 1971. Éditions Off Rech Sci Tech Outre-Mer, Paris, pp. 89-95.
  10. Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fúster F, Molina R. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. Parasitol. Res. 2013; 112:2453-59.
  11. González E, Jiménez M, Hernández S, Martín-Martín I, Molina R. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis of Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *L. infantum* infection rates and blood meal preferences. Parasites & Vectors. 2017; 10: 368.
  12. El Tai N0, Osman OF, El Far M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2000; 94: 575-579.
  13. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. Microbes Infect. 2005; 7: 1224-34.
  14. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Euro Surveill. 2013; 18: 20545.
  15. Martín-Martín I, Jiménez M, González E, Eguiluz C, Molina R. Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. Veterinary Research. 2015; 46: 138.
  16. Domínguez-Bernal G, Jiménez M, Molina R, Ordóñez-Gutiérrez L, Martínez-Rodrigo A, Mas A, Cutuli MT, Carrión J. Characterisation of the ex vivo virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from

- an outbreak of human leishmaniosis in Madrid, Spain. *Parasites & Vectors*. 2014; 7: 499.
17. Mas A, Martínez-Rodrigo A, Orden Ja, Molina R, Jiménez M, Jiménez Ma, Carrión J, Domínguez-Bernal G Properties of virulence emergence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* collected during the human leishmaniosis outbreak in Madrid, Spain. Hepatic histopathology and immunological parameters as virulence markers in the mouse model. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2020; 68: 704-714.
  18. Mas A, Martínez-Rodrigo A, Orden JA, Viñals LM, Domínguez-Bernal G, Carrión J. A further investigation of the leishmaniosis outbreak in Madrid (Spain): low-infectivity phenotype of the *Leishmania infantum* BOS1FL1 isolate to establish infection in canine cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2020; 230: 110148.
  19. Miró G, Müller A, Montoya A, Checa R, Marino V, Marino E, Fuster F, Escacena C, Descalzo MA, Gálvez R. Epidemiological role of dogs since the human leishmaniosis outbreak in Madrid. *Parasites & Vectors*. 2017; 10: 209.
  20. Rogers M, Bates P. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog*. 2007; 3: 818-825.
  21. González E, Álvarez A, Ruiz S, Molina R, Jiménez M. Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR. *Acta Tropica*. 2017; 171: 68- 73.
  22. González, E, Molina R, Jiménez M. Rabbit trypanosome detection in *Phlebotomus perniciosus* sand flies from the leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. *Acta Tropica*. 2018, 187: 201-206.
  23. González E, Molina R, Iriso A, Hernández S, Ruiz S, Aldea I, Fernández D, Tello A, Jiménez M. Opportunistic feeding behavior and *Leishmania infantum* detection in *Phlebotomus perniciosus* females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012-2018). *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15: e0009240.
  24. González E, Molina R, Aldea I, Iriso A, Tello, A, Jiménez M. *Leishmania* sp. detection and blood-feeding behaviour of *Sergentomyia minuta* collected in the human leishmaniasis focus of southwestern Madrid, Spain (2012-2017). *Transbound Emerg Dis*. 2020, 67: 1393-1400.

25. Jiménez M, González E, Díaz-Regañón R, Iriso A, Martín-Martín I, Molina R. Vigilancia de flebotomos en el nordeste de la Comunidad de Madrid: Aislamiento y caracterización de tripanosomátidos de *Phlebotomus perniciosus* y *Sergentomyia minuta*. ParaJournal. Revista de la Sociedad de Parasitología Española (SOCEPA). 2022, 228.

## CAPÍTULO 10

# Aportaciones del xenodiagnóstico en el contexto del brote de leishmaniasis de Fuenlabrada

Ricardo Molina<sup>1,6</sup>, Estela González<sup>1</sup>, Andrés Iriso<sup>2</sup>, Juan Víctor San Martín<sup>3,6</sup>, Inés Martín Martín<sup>1</sup>, Jorge Alvar<sup>4</sup>, Javier Moreno<sup>5,6</sup>, Eugenia Carrillo<sup>5,6</sup>, Maribel Jiménez<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Entomología Médica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>2</sup> Sección de Zoonosis y Riesgos Biológicos, Área de Vigilancia de Riesgos Ambientales en Salud, Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid.

<sup>3</sup> Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Fuenlabrada.

<sup>4</sup> Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi).

<sup>5</sup> Laboratorio de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>6</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

## INTRODUCCIÓN

El xenodiagnóstico es un procedimiento de diagnóstico en el que se utiliza el artrópodo vector apropiado como instrumento para la detección en hospedadores vertebrados de la infección por patógenos transmitidos vectorialmente en la naturaleza (1). Esta metodología permite probar la presencia de un parásito u otro patógeno en un vertebrado utilizando un animal de otra especie, generalmente el hospedador invertebrado (vector) de la enfermedad. De este modo el agente patógeno podrá ser identificado con más facilidad, sobre todo si se deja transcurrir el periodo de incubación suficiente que permita su multiplicación dentro del vector en tal cantidad que facilite su visualización mediante microscópica óptica directa, de hecho, y salvando las distancias, podría ser considerado como una «PCR biológica». Resulta especialmente útil cuando la concentración del parásito en el hospedador vertebrado a estudiar es tan reducida que hace inviable el diagnóstico mediante

microscopía óptica. El xenodiagnóstico es muy específico y relativamente sensible, y ha sido durante mucho tiempo el método parasitológico clásico para determinar y cuantificar la transmisibilidad desde un hospedador vertebrado concreto a una especie de artrópodo vector. Aporta datos concluyentes para distinguir hospedadores infecciosos de no infecciosos. Fue utilizado por primera vez en Brasil (2) en 1914 para identificar la infección por tripanosomas en una culebra de agua. Esta técnica lleva décadas utilizándose, incluso hoy en día todavía se utiliza en ocasiones muy concretas, como el aislamiento y/o identificación de *Trypanosoma cruzi* en individuos infectados, por tratarse además de un método económico y fácil de utilizar en el diagnóstico de la infección por este parásito. En la actualidad, es una herramienta que también se ha empleado para aislar y/o identificar *Borrelia* sp., utilizando garrapatas; arbovirus, usando culícidos y otros dípteros hematófagos; o *Leishmania* sp., usando flebotominos (3). El xenodiagnóstico de la leishmaniasis causada por *Leishmania infantum* se ha utilizado en nuestro entorno con diferentes propósitos, tanto en la leishmaniasis humana como canina. Por ejemplo, ha servido para demostrar que los perros asintomáticos con leishmaniasis pueden llegar a ser tan infectivos como los sintomáticos (4-7), aspecto epidemiológico de enorme trascendencia que ha sido tenido en cuenta en los programas de control de la enfermedad. También es una metodología especialmente útil en el seguimiento parasitológico-entomológico de perros tratados frente a esta enfermedad (8-11). En el ser humano, el xenodiagnóstico se ha empleado tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos, con especial interés en estos últimos, antes y después de ser tratados de leishmaniasis (12-15). Con esta metodología se ha demostrado que los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) transmiten con suma facilidad los parásitos a los flebotomos (13,14). El xenodiagnóstico también es el método de elección para ser utilizado con fines epidemiológicos en la investigación del papel que puedan jugar determinados reservorios potenciales, incluyendo los seres humanos, en la propagación de enfermedades transmitidas por vectores (1,16). Proporciona datos concluyentes para distinguir hospedadores infecciosos de no infecciosos. En concreto, ha resultado especialmente útil en el estudio de los reservorios silvestres presentes en la zona del brote de leishmaniasis de Fuenlabrada y municipios colindantes, en particular de liebres y conejos, lepóridos muy abundantes en Bosquesur, un gran parque destinado al uso y disfrute de la población que se encuentra rodeado por grandes áreas urbanas como Fuenlabrada, Leganés, Alcorcón y Getafe (17-20). También se ha empleado en este brote de leishmaniasis de Fuenlabrada para estudiar individuos con leishmaniasis visceral (LV) inmunocompetentes e inmunodeprimidos (21).

Ha sido en los últimos años cuando ha resurgido un notable interés por conocer si la infección humana por *L. infantum* asintomática juega algún papel en la transmisión de leishmaniasis. En general, una buena parte de las infecciones por *Leishmania* cursan de manera asintomática, gozando estos individuos de buena salud y, por lo tanto, no son objeto de tratamiento alguno. El período de incubación de la leishmaniasis es variable y en líneas generales dura varios meses. Dado que los sujetos infectados asintóticamente superan en gran medida a los casos clínicos de leishmaniasis, podrían desempeñar un papel importante en la transmisión, aun si fueran menos infecciosos que los casos clínicos. Pero para evaluar hasta qué punto son infecciosos para los flebotomos que se alimenten de ellos, primero tenemos que identificarlos con precisión. Esa es la clave porque en la actualidad no existen herramientas validadas para el seguimiento de la infección por *Leishmania*. Las pruebas serológicas utilizadas habitualmente en el diagnóstico de la LV, como el test rápido inmunocromatográfico TIC-rK39, el ELISA rK39 y la aglutinación directa, están validadas para detectar la enfermedad, pero no para detectar la infección. Se sabe que la mayor parte de las personas sanas con serología de leishmaniasis positiva jamás desarrollarán la enfermedad y que, además, no es infrecuente detectar ADN de *L. infantum* en la sangre de donantes con infección asintomática. Sin duda, los parásitos vivos están presentes en los hospedadores asintomáticos, pero se desconoce su potencial infeccioso sobre los flebotomos, y es aquí donde resultan trascendentales los estudios de xenodiagnóstico. Urge, por tanto, despejar esta incógnita lo antes posible para orientar de manera adecuada los programas de eliminación de la leishmaniasis.

Existen dos modalidades de xenodiagnóstico: en el xenodiagnóstico directo, se utilizan insectos vivos para la detección de patógenos viables en vertebrados hipotéticamente infectados. Como se dijo anteriormente, este es el método históricamente empleado para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana causada por *T. cruzi* en el que se utilizan hemípteros reducidos en individuos sospechosos de estar infectados por el parásito. El xenodiagnóstico indirecto, por otro lado, se refiere a artrópodos que se alimentan experimentalmente de sangre heparinizada, a través de una membrana de alimentación consistente generalmente en piel de pollo. Este método evitaría los inconvenientes que puede plantear el xenodiagnóstico directo, principalmente en lo concerniente a la hipersensibilidad a las picaduras de insectos (1).

Como ya se señaló, el xenodiagnóstico puede emplearse en la investigación de las singularidades de la transmisión de *L. infantum* en áreas endémicas para aportar evidencias epidemiológicas y clínicas esenciales en el diseño de programas de control

de la leishmaniasis. Dicha información posee múltiples implicaciones prácticas que incluyen:

1. determinación del papel de la terapia profiláctica en la infección asintomática incidente;
2. evaluación de vacunas que prevengan la infección o la infectividad;
3. determinación de la duración de los programa de control vectorial;
4. investigación de la importancia de la transmisión antroponótica o zoonótica de la leishmaniasis;
5. comprensión del papel de la infección asintomática en la transmisión del parásito;
6. seguimiento de la eficacia del tratamiento de leishmaniasis en términos de transmisibilidad del parásito hacia los flebotomos;
7. determinación de la infectividad sobre los flebotomos y de las tasas de infección, que aportará información sobre el curso de las infecciones naturales por LV que servirá para la optimización de los modelos que pronostiquen la aparición y el progreso de epidemias de LV (1).

Uno de los objetivos esenciales en los estudios llevados a cabo en la zona del brote de leishmaniasis de Fuenlabrada se ha centrado en la investigación, aplicando la metodología del xenodiagnóstico, del papel epidemiológico que pudieran estar jugando en la transmisión de la leishmaniasis los lepóridos —liebres y conejos— presentes en la zona del brote, dada su gran abundancia en las zonas verdes del parque Bosquesur. El segundo objetivo en importancia ha consistido en explorar el papel como potenciales reservorios de la enfermedad de los individuos con leishmaniasis asintomática, en especial de aquellas personas residentes en el municipio de Fuenlabrada. Simultáneamente, se ha prestado una especial atención al estudio de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos con leishmaniasis activa en la zona del brote, antes y después de ser tratados de leishmaniasis.

## **METODOLOGÍA UTILIZADA EN LAS DIFERENTES VARIANTES DE XENODIAGNÓSTICO**

### **Xenodiagnóstico directo (XDD) de la leishmaniasis en liebres y conejos**

- Colocar en una jaula 100 hembras de *P. perniciosus* de 7 días de edad procedentes de una colonia establecida en el laboratorio (22). Añadir 20-25 machos.

- Anestesiarse los animales con 15 mg/kg de ketamina + 2-3 mg/kg de xilacina por vía intramuscular y aguardar a que estén profundamente dormidos.
- Introducir cada animal anestesiado en una jaula con los flebotomos, anudar la manga de la jaula y cubrirla por completo con un paño grueso negro. Para minimizar las fugas mientras se introduce el animal, siempre debe haber detrás de la jaula una potente fuente de luz para que los flebotomos permanezcan en el lado opuesto a la manga de la jaula.
- Dejar que los flebotomos se alimenten del animal anestesiado durante 1 hora.
- Transcurrido el periodo de exposición, sacar al animal de la jaula, retirar los flebotomos no alimentados con un aspirador eléctrico y sacrificarlos con CO<sub>2</sub>.
- La jaula con las hembras alimentadas con sangre se llevará a una cámara climática a 27 °C, 95-100% de humedad y un fotoperiodo de 17 horas de luz y 7 horas de oscuridad.
- Suministrar diariamente a las hembras una pella de algodón empapada en azúcar al 30%.
- Las disecciones de los tubos digestivos de las hembras supervivientes comenzarán a los 5 días de la alimentación para detectar la presencia de promastigotes y determinar, si procediera, las tasas de flebotomos infectados. Se realizan colocando cada hembra individualmente en una gota de PBS estéril, previamente depositada sobre un portaobjetos estéril. A continuación, con la ayuda de agujas entomológicas estériles, se eliminan cabeza, alas y patas, y se extrae por completo el tubo digestivo que se transferirá a otra gota de PBS estéril, depositada en el mismo portaobjetos. Finalmente, se coloca un cubreobjetos estéril sobre el tubo digestivo para ser examinado en un microscopio óptico (400X) en busca de promastigotes de *Leishmania* sp.
- Si se observan flagelados en el tubo digestivo se presiona cuidadosamente sobre el cubreobjetos hasta que el tubo digestivo se rompa y se liberen los promastigotes. Finalmente se retira el cubreobjetos, con la ayuda de unas pinzas estériles de punta muy fina, y se inocula todo el contenido de la gota en un tubo de medio NNN, utilizando una pipeta Pasteur estéril. El objetivo es el aislamiento de la cepa de *Leishmania* y su conservación a -80 °C para su identificación y caracterización molecular posterior, de acuerdo al análisis de las secuencias ITS1, ITS2.
- Una vez disecadas todas las hembras supervivientes, si el animal resultase infectivo se calcularán las correspondientes tasas de flebotomos infectados.

### XDD de la leishmaniasis realizado en humanos

- Como paso previo, cualquier individuo con un historial de alergia a las picaduras de insectos será excluido de los ensayos de XDD. También serán descartados los sujetos con niveles elevados de IgE.
- Introducir la mano del paciente en una jaula pequeña que contenga 25 hembras de *P. perniciosus* de 7 días de edad, durante 15 minutos. Previamente, los pacientes deben lavarse concienzudamente las manos pues cualquier rastro de nicotina o cualquier otra sustancia podría interferir negativamente en la alimentación.
- Transcurrido el periodo de exposición, se retiran de la jaula las hembras no alimentadas con un aspirador eléctrico y se sacrifican con CO<sub>2</sub>.
- Al mismo tiempo, se aplica durante 15 minutos un tubo con 15 hembras de *P. perniciosus* de 7 días de edad directamente sobre la piel de la región antebraquial del antebrazo del paciente (13,23).
- Las jaulas con las hembras repletas de sangre se llevarán a la cámara climática, con las mismas condiciones ambientales indicadas anteriormente, hasta la realización de las disecciones.
- A partir de este paso se procederá de la misma manera descrita con anterioridad para el XDD de lepóridos, con el objeto de determinar las tasas de flebotomos infectados por *Leishmania*.

En el panel de la [Figura 1](#) se muestra alguna de las fases más representativas del XDD, llevados a cabo en liebres y conejos.

**Figura 1. Xenodiagnóstico directo de leishmaniasis en liebres y conejos [Fuente: Laboratorio de Entomología Médica (LEM), Centro Nacional de Microbiología (CNM)].**



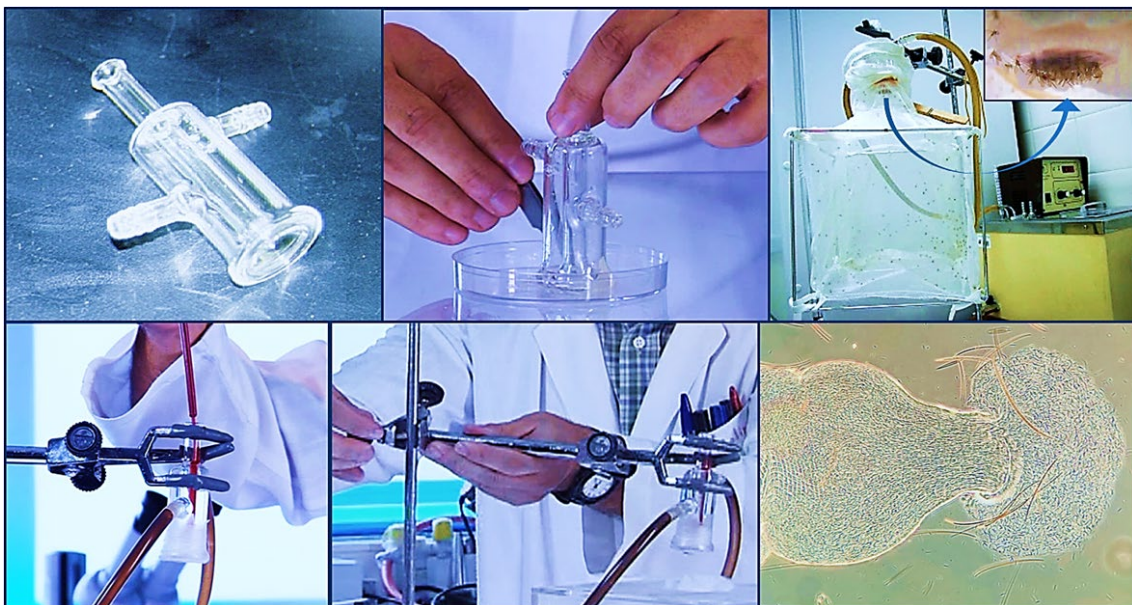
### Xenodiagnóstico indirecto (XDI) de la leishmaniasis

- Poner en una jaula 100 hembras de *P. perniciosus* de 7 días de edad procedentes de la colonia de laboratorio. Añadir 20-25 machos.
- Calentar a 37 °C un baño equipado con mecanismo de recirculación de agua.
- Cubrir la abertura de mayor diámetro del dispositivo de alimentación artificial con una membrana de alimentación, por lo general piel de pollo de 2-3 días de edad, y fijarla firmemente con Parafilm.
- Depositar por la abertura de menor diámetro del dispositivo de alimentación artificial la muestra de sangre heparinizada a estudiar (1,5 ml como mínimo), con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico estéril.
- Introducir la parte inferior del dispositivo de alimentación con la membrana a través de la manga de la jaula que contiene los flebotomos y sujetarla firmemente mediante anillas de goma.

- Dejar el dispositivo en la jaula durante 1-2 horas para obtener unas óptimas tasas de flebotomos alimentados.
- Transcurrido el periodo de exposición, retirar la jaula del dispositivo de alimentación, separar las hembras no alimentadas y sacrificarlas con CO<sub>2</sub>.
- La jaula con las hembras alimentadas con sangre se llevará a una cámara climática a las mismas condiciones ambientales ya descritas.
- A partir de este paso se procederá de la misma manera descrita con anterioridad en el caso del XDD, con el objeto de determinar las tasas de flebotomos infectados por *Leishmania*.

En el panel de la [Figura 2](#) se presentan algunas fases de la metodología del XDI.

**Figura 2. Xenodiagnóstico indirecto de leishmaniasis con muestras de sangre de origen humano (Fuente: LEM, CNM).**



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Seguidamente, se muestran los resultados de los diferentes ensayos de xenodiagnóstico llevados a cabo, todos ellos en el contexto del brote de leishmaniasis de Fuenlabrada.

### XDD de leishmaniasis en liebres (*Lepus granatensis*)

Se efectuó en dos sesiones con 7 liebres aparentemente sanas capturadas vivas mediante redes en la zona del brote, durante el invierno de 2011-2012. Se seleccionaron preferentemente animales con una serología positiva a *L. infantum*, utilizando para ello la prueba TIC-rK39 (Kalazar Detect® Canine Rapid Test, InBios). En 4 de las liebres (57,1%) el xenodiagnóstico fue positivo, infectando en promedio el 5,1% (0 - 10,6%) de las hembras de *P. perniciosus* disecadas (Tabla 1).

Tras el aislamiento y posterior cultivo satisfactorio en masa de tres de esos aislados, se dio paso a la realización de la caracterización molecular. El análisis de las secuencias de sus regiones ITS puso de manifiesto una concordancia del 100% de identidad con la cepa de *L. infantum* MHOM/ES/87/Lombardi anotada en GenBank en 1987 (n.º de acceso: AJ000295).

**Tabla 1. Resultados de los xenodiagnósticos directos de leishmaniasis realizados a liebres y conejos.**

XENODIAGNÓSTICO	FECHA	FLEBOTOMOS ALIMENTADOS	FLEBOTOMOS DISECADOS	FLEBOTOMOS INFECTADOS (%)
LIEBRES	01/12/2011	85	63	5 (7,9%)
		55	25	0
	11/01/2012	75	47	5 (10,6%)
		58	38	2 (5,3%)
		82	45	0
		63	42	0
		80	33	3 (9,1%)
	TOTAL	498	293	15 (5,1%)
CONEJOS	04/03/2013	48	33	0
		99	83	0
		86	65	1 (1,5%)
		72	54	1 (1,9%)
	09/10/2013	57	50	1 (2%)
		67	45	0
		71	61	1 (1,6%)
		36	23	0
		90	53	1 (1,9%)
	80	64	0	
	TOTAL	706	531	5 (0,9%)

Las elevadas poblaciones de liebres observadas en las zonas verdes del parque Bosquesur, alrededor de 265 liebres por km<sup>2</sup> (24), en combinación con las altas prevalencias de la infección por *L. infantum* detectadas en las liebres capturadas

en la zona, con seroprevalencias del 74,1% y con presencia de ADN del parásito en bazo y/o piel en el 29% (24,25), ya sugerían una alta probabilidad de que estos lepóridos podían estar jugando un papel relevante como reservorios de *L. infantum* en el escenario del brote. En paralelo, se determinó también que las liebres son una excelente fuente de alimentación de sangre para los flebotomos, tal y como se desprende de los estudios realizados en nuestro laboratorio sobre el origen de la sangre ingerida por los flebotomos capturados en el parque Bosquesur (19) y a la detección de elevados niveles de anticuerpos frente a la saliva de *P. perniciosus* mediante ELISA en suero obtenido de sangre de liebres capturadas en la zona del brote (26).

Los resultados derivados de los xenodiagnósticos realizados han evidenciado, por vez primera para la ciencia, la capacidad de las liebres ibéricas (*L. granatensis*) parasitadas por *L. infantum* de infectar hembras de *P. perniciosus*, el vector competente y predominante en la zona (18). De este modo se ha podido demostrar de manera incontestable la implicación de estos lepóridos como reservorios silvestres de *L. infantum* en la zona del brote de leishmaniasis del suroeste de la Comunidad de Madrid (17,18).

A raíz de este hallazgo, estudios posteriores realizados mediante PCR en otros laboratorios, con muestras de liebres procedentes de diferentes áreas geográficas de España, han corroborado que las prevalencias de las infecciones alcanzan valores muy elevados, tanto en *L. granatensis* como en *Lepus europaeus*, las dos especies de liebres más abundantes en la Península Ibérica (27).

Estos datos, analizados en su conjunto, poseen un importante valor epidemiológico ya que aportan una información de gran valor para el adecuado diseño de los planes de vigilancia y control de la enfermedad, que deberán tener en cuenta, entre otras medidas, la implementación de actuaciones contundentes frente a estos nuevos reservorios de *L. infantum*.

### **XDD de leishmaniasis en conejos de campo (*Oryctolagus cuniculus*)**

Se estudiaron 10 conejos aparentemente sanos, también en dos sesiones, seropositivos a *L. infantum* mediante la prueba TIC-rK39, capturados en las inmediaciones de la zona afectada por el brote en los meses de marzo y octubre de 2013. Cinco de los 10 conejos estudiados (50%) fueron capaces de infectar a los flebotomos. Concretamente, se detectaron promastigotes de *Leishmania* en un promedio del 0,9% (0 - 2%) de las hembras de *P. perniciosus* disecadas. Los resultados de los estudios de xenodiagnóstico realizados a conejos se presentan en la [Tabla 1](#).

El cultivo satisfactorio de 4 de los 5 aislados de *Leishmania* y la posterior extracción y análisis de las secuencias de ADN permitieron confirmar la presencia de *L.*

*infantum* en todos ellos, mediante la amplificación del gen *cpb*. La caracterización molecular de acuerdo con la secuenciación de las regiones transcritas internas, ITS1 e ITS2, estableció que los 4 aislados eran idénticos a los encontrados en liebres, por consiguiente, pertenecían al genotipo «Lombardi» de *L. infantum*.

En otros estudios realizados se han evidenciado unas altas seroprevalencias frente a *L. infantum* en conejos capturados en Madrid (24). En la zona afectada por el brote había sido detectado inicialmente ADN de *L. infantum* (2011 y 2012) en bazo y/o piel del 1,5% de los conejos estudiados (24), cifra que se ha visto sensiblemente incrementada con posterioridad. Por otro lado, la seroprevalencia de la leishmaniasis en estos lagomorfos mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) se eleva al 45,7% en la misma zona (25).

Los estudios de xenodiagnóstico en conejos de campo infectados de forma natural con *L. infantum* han demostrado por vez primera, al igual que ha sucedido con las liebres, su capacidad de transmitir el parásito al vector competente en la zona, *P. perniciosus*, aunque aparentemente en menor medida que las liebres (5,1% infectados de liebres frente a 0,9% de conejos) (17).

En cualquier caso, se ha determinado que los conejos también constituyen una excelente fuente de alimentación de sangre, tal y como se desprende de los estudios realizados sobre el origen de la sangre ingerida por flebotomos capturados en el campo (19) y sobre la detección de anticuerpos frente a la saliva de *P. perniciosus*, mediante ELISA, en el suero de conejos de Bosquesur (26).

Las medidas de control encaminadas a la reducción de reservorios silvestres en la zona del brote, llevadas a cabo desde 2012, hicieron descender drásticamente la población de liebres, lo que parece debió alterar los hábitos alimenticios del vector, que ha pasado de alimentarse preferentemente de liebres (19) a alimentarse de conejos (17). Como los conejos de campo han demostrado ser una buena fuente de alimentación sanguínea para los flebotomos, además de ser capaces de transmitir el parásito al vector competente, también podrían estar desempeñando un papel como reservorios de la leishmaniasis, si bien en menor medida en comparación con las liebres. En cualquier caso, este hallazgo también ha de ser tenido muy en consideración en este brote de leishmaniasis.

Los estudios de xenodiagnóstico se llevaron a cabo en su mayor parte en unas fechas, sobre todo los realizados con las liebres, en las que la zona se encontraba libre de flebotomos, al hallarse en letargo invernal (17,18), lo que sería una muestra de que estos leporidos estarían padeciendo infecciones crónicas asintomáticas de la enfermedad. Se erigen pues estos leporidos como eficaces reservorios de *L. infantum*, dada su notable capacidad para albergar parásitos viables hasta el siguiente

periodo de actividad de los flebotomos. En consecuencia, se mantendría estable la transmisión de la enfermedad una vez los flebotomos salgan de su letargo invernal y se alimenten de ellos.

La caracterización molecular de los aislados de *L. infantum* procedentes de liebres y conejos comparten el genotipo responsable de la mayoría de los casos de leishmaniasis humana del brote (genotipo «Lombardi») (28), genotipo detectado también en los flebotomos capturados en la misma zona (19). Todos estos datos vienen a confirmar la hipótesis sobre la implicación de estos leporidos como reservorios silvestres de *L. infantum* en la zona del brote.

En definitiva, los estudios de xenodiagnóstico llevados a cabo entre los leporidos del área del brote demuestran que, tanto liebres como conejos, están jugando un papel importante, aunque en diferente proporción, como reservorios de *L. infantum* en el brote. Este hallazgo pone de manifiesto la existencia de un ciclo silvestre de transmisión de la leishmaniasis en el parque Bosquesur, independiente del doméstico tradicional, más vinculado a las áreas urbanas y al perro.

### Xenodiagnósticos de la leishmaniasis realizados en humanos

Para intentar comprender mejor el papel que pudieran desempeñar las personas con leishmaniasis, sintomática y asintomática, en la transmisión de la enfermedad en la zona del brote de Fuenlabrada, se llevó a cabo un estudio descriptivo de la infectividad hacia flebotomos de humanos infectados por *L. infantum*, mediante la utilización del xenodiagnóstico, en colaboración con el Hospital de Fuenlabrada, centro sanitario de referencia que ha diagnosticado de largo el mayor número de casos del brote.

En total, participaron 50 individuos en los diferentes estudios, 26 pacientes y 24 donantes de sangre. Se realizaron 66 xenodiagnósticos (62 XDI y 4 XDD) y fueron disecados 5151 flebotomos en total. En 4 pacientes los xenodiagnósticos fueron positivos: 1 paciente inmunodeprimido coinfectado por VIH/*L. infantum* sin síntomas de leishmaniasis (mediante XDI y XDD), 1 paciente inmunodeprimido con mieloma múltiple y LV activa (mediante XDI) y 2 pacientes inmunocompetentes con LV activa (mediante XDI). Las muestras de sangre de los donantes de sangre fueron todas negativas, tanto por XDI como por PCR.

### Pacientes con leishmaniasis visceral activa

Antes de recibir el tratamiento de LV, 2 de los 12 pacientes inmunocompetentes (16,7%) fueron positivos mediante XDI (Tabla 2), con unas tasas de infección de

flebotomos por *L. infantum* que oscilaron entre el 5,5% y el 1% (3,3% en promedio). La proporción de pacientes con LV activa que resultó infecciosa para los flebotomos fue por lo tanto bastante baja. A uno de los pacientes se le había diagnosticado una leishmaniasis mucocutánea traqueal. De las 1071 hembras de flebotomos disecadas, alimentadas sobre estos pacientes, 5 (0,5%) fueron positivas (Tabla 2).

**Tabla 2. Xenodiagnóstico indirecto de leishmaniasis realizado con la sangre heparinizada de pacientes inmunocompetentes con LV, no tratada (pacientes 1 a 12) y tratada (pacientes 13 a 23).**

Paciente	Edad (años)	Fecha toma muestra	TIC - rK39	PCR	qPCR parásitos/ $\mu$ l	♀ disecadas / ♀ infectadas	XDI	Tratados de LV
1 <sup>a</sup>	72	07/07/2015	+	-	0	98/0	-	No
2	69	15/01/2016	+	+	152,6	106/0	-	No
3	33	01/04/2016	+	+	706	90/0	-	No
4	46	15/04/2016	+	-	0	100/0	-	No
5	42	28/04/2016	+	-	0	100/0	-	No
6	1.3	02/05/2016	+	-	0	66/0	-	No
7	88	04/05/2016	+	-	106	98/0	-	No
8 <sup>b</sup>	45	09/05/2016	+	+	1050	73/4 (5,5%)	+	No
9	5	12/05/2016	+	+	27,3	62/0	-	No
10	54	11/07/2016	+	-	0	104/0	-	No
11	1.4	13/09/2016	+	+	99	104/1 (1%)	+	No
12 <sup>c</sup>	41	22/11/2017	+	+	358	70/0	-	No
13	45	21/06/2016	+	-	NR	95/0	-	Si
14	51	17/11/2015	-	-	NR	108/0	-	Si
15	65	25/11/2015	+	-	NR	100/0	-	Si
16	66	05/04/2016	+	-	NR	100/0	-	Si
17	55	17/05/2016	+	-	NR	70/0	-	Si
18	85	18/06/2016	+	-	NR	82/0	-	Si
19	51	08/09/2016	+	-	NR	100/0	-	Si
20	33	14/09/2016	+	-	NR	52/0	-	Si
21	0.4	14/12/2016	+	-	NR	72/0	-	Si
22	80	25/01/2017	-	+	NR	45/0	-	Si
23	36	01/12/2017	+	-	NR	75/0	-	Si

TIC, test inmunocromatográfico; XDI, xenodiagnóstico indirecto; NR, no realizado; LV, leishmaniasis visceral. <sup>a</sup>Leishmaniasis traqueal.

<sup>b</sup>XDI realizado 11 días después de la extracción de sangre. <sup>c</sup>XDI realizado 13 días después de la extracción de sangre.

Las muestras de sangre de todos los pacientes fueron positivas mediante TIC-rK39. Las PCRs y qPCRs fueron positivas en 7 pacientes (58,3%), con una carga parasitaria (CP) media de 356,9 parásitos/μl. Por tanto, las CPs no muestran una buena correlación con la infectividad frente a los flebotomos en este grupo de pacientes ([Tabla 2](#)). Esa escasa correlación observada sugiere que la infectividad podría proceder en parte a una fuente adicional de parásitos, como pudiera ser la piel, o a una liberación aleatoria de parásitos.

Es interesante destacar que la sangre de un paciente continuó siendo infecciosa al menos 11 días después de la extracción, almacenada a 4 °C. Los bancos de sangre deben tomar buena nota de este hallazgo y gestionar con especial precaución la sangre (incluyendo una leucorreducción) de donantes que viven en zonas endémicas de leishmaniasis, para prevenir la transmisión transfusional de la leishmaniasis. En cuanto a los pacientes inmunocompetentes tratados de leishmaniasis es destacable que ninguno resultó infectivo para los flebotomos, demostrando que el tratamiento de la LV es muy eficaz entre estos enfermos.

### Pacientes inmunodeprimidos con leishmaniasis

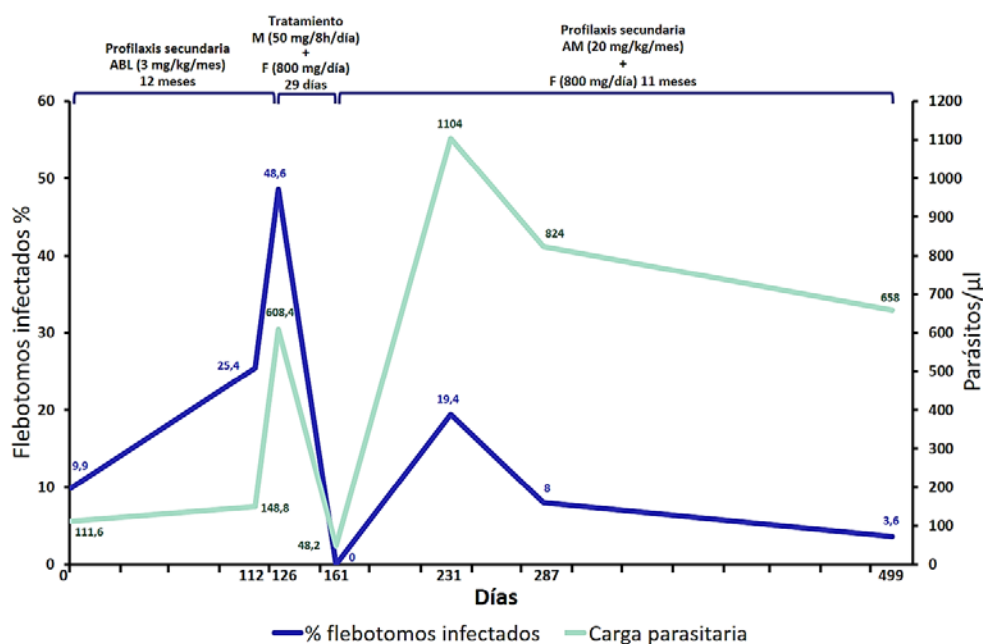
Dos de los 3 pacientes inmunodeprimidos investigados (66,7%) fueron positivos mediante xenodiagnóstico. Se disecaron 1284 flebotomos, hallándose 123 (9,6%) positivos ([Tabla 3](#)).

#### *Paciente inmunodeprimido, VIH/L. infantum coinfectado, con leishmaniasis asintomática*

Este paciente se encontraba bajo terapia antirretroviral (TAR) desde 2011. Fue diagnosticado de leishmaniasis en abril de 2012 a partir de una biopsia hepática y desde ese momento, hasta noviembre de 2016, se mantuvo repetidamente infeccioso para los flebotomos mediante XDI, sin mostrar en ningún momento síntomas compatibles con LV. En ese periodo de tiempo le fueron administrados al paciente tratamientos y profilaxis secundarias frente a leishmaniasis. Seis de los siete XDIs llevados a cabo (85,7%) fueron positivos. El primer XDI realizado infectó al 9,9% de los flebotomos y el último al 3,6% ([Tabla 3](#), [Figura 3](#)), con unas tasas de infección que oscilaron entre el 3,6% y el 48,6% y una tasa media de infección del 18,6%. El XDI realizado en diciembre de 2015 fue negativo, probablemente debido a que la muestra de sangre llegó al laboratorio mal preservada y hemolizada, por lo que tan solo se pudo llevar a cabo la detección de ADN de *Leishmania* mediante PCR. Todas las muestras de sangre utilizadas en los XDIs fueron positivas mediante PCR y TIC-rK39. En cuanto a los XDDs realizados en octubre de 2015 fueron ambos

positivos, los flebotomos alimentados de la mano y del antebrazo del paciente se infectaron un 12% y un 7,7%, respectivamente. La heterogeneidad en la infectividad hacia los flebotomos observada en los XDDs realizados en la mano y el brazo de este paciente sugeriría que en estos sujetos inmunodeprimidos coinfectados *L. infantum* se diseminaría por la piel de manera irregular. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que en estos enfermos la sangre representa una fuente importante de parásitos en la infección de los flebotomos, como se demuestra en este estudio. El XDI realizado, en la misma fecha que los XDDs, con la sangre extraída de este mismo paciente, infectó al 25,4% de los flebotomos alimentados (Tabla 3). Las CPs obtenidas mediante qPCR de las muestras de sangre de este paciente no guardan una buena correlación con las tasas de infección por flebotomos obtenidas mediante xenodiagnóstico (Figura 3), aunque las diferencias son claras si las comparamos con las obtenidas de pacientes inmunocompetentes con LV. Parece que la proporción de pacientes con LV que albergan parásitos en piel sana es relativamente baja y apunta a un papel moderado en la transmisión. Que los pacientes coinfectados puedan estar desempeñando un papel como «supercontagiadores» de la leishmaniasis en el brote es una cuestión aún por verificar (16), aunque cuentan a su favor con la posición y agrupación de casos observada en el brote de Fuenlabrada (29), que explicaría su larga duración a pesar de las drásticas medidas implementadas en el control de lepidóridos.

**Figura 3. Tratamiento y profilaxis secundaria administrados al paciente HIV/*L. infantum* coinfectado. Monitorización mediante xenodiagnóstico indirecto de su infectividad hacia los flebotomos durante de 17 meses. F, fluconazol; ABL, anfotericina B liposomal; AM, antimonio de meglumina; M, miltefosina.**



### *Paciente inmunodeprimido VIH/L. infantum coinfectado con LV sintomática*

Este paciente fue diagnosticado de leishmaniasis a partir de una muestra de aspirado de médula ósea efectuado en marzo de 2012. Desde ese momento, y a lo largo del estudio, fue recibiendo tratamiento o profilaxis secundaria de leishmaniasis y estaba sometido a TAR. Los 6 XDI's realizados con las muestras de sangre extraídas al paciente, de abril de 2015 a junio de 2016, fueron reiteradamente negativos. Las PCR's de *L. infantum* realizadas con las mismas muestras de sangre también fueron negativas. En cuanto a los dos XDD's llevados a cabo en octubre de 2015 en la mano y el antebrazo del paciente fueron igualmente negativos. En cambio, todas las muestras de sangre fueron positivas a *L. infantum* mediante TIC-rK39 ([Tabla 3](#)).

### *Paciente inmunodeprimida con mieloma múltiple IgA- $\lambda$ y LV activa*

Paciente con tratamiento inmunosupresor (lenalidomida y dexametasona). El XDI realizado antes de instaurar el tratamiento de leishmaniasis evidenció una tasa de infección de flebotomos del 30,6%. Después de ser tratada la paciente frente a leishmaniasis con anfotericina B liposomal los dos XDI's realizados 5 y 22 semanas después del tratamiento fueron negativos, demostrando que la paciente dejó de ser infecciosa al menos los 6 meses posteriores al tratamiento ([Tabla 3](#)). Estos resultados muestran por vez primera que un paciente inmunodeprimido con LV y mieloma múltiple, es capaz de infectar a los flebotomos antes de ser instaurado el tratamiento, con una tasa de infección significativa.

Los resultados obtenidos con los dos pacientes VIH/*L. infantum* coinfectados inmunodeprimidos han puesto de manifiesto que uno de ellos, con leishmaniasis asintomática, fue infectivo para los flebotomos antes y después de recibir diferentes terapias, con tasas de infección relativamente altas durante los casi 17 meses de seguimiento por XDI. El restablecimiento inmune incompleto en este paciente probablemente ha podido contribuir a dificultar la eliminación del parásito. Una observación similar fue advertida previamente en un estudio realizado con un paciente coinfectado por VIH monitoreado durante 5 años (Molina, no publicado). Hay que señalar aquí que el grado de infectividad hacia los flebotomos de este paciente cayó abruptamente cuando fue tratado con una combinación de miltefosina y fluconazol y cuando se le administró un régimen de profilaxis secundaria a base de antimonio de meglumina y fluconazol ([Figura 3](#)). En cualquier caso, es bien conocido que los pacientes VIH/*L. infantum* coinfectados son infecciosos para los flebotomos, como ya se señaló con anterioridad ([30-32](#)).

**Tabla 3. Xenodiagnóstico realizado a los 3 pacientes inmunodeprimidos infectados con *Leishmania infantum* cuando acudieron al hospital para seguimiento.**

Paciente	Edad en años	Toma de muestra Tipo de muestra	TIC - rK39	PCR	qPCR parásit./ $\mu$ l	♀ disecadas / ♀ infectadas	XDI	XDD	Estado clínico
24	83	28/04/2016 SH <sup>a</sup>	+	+	+ 4360	36/11 (30.6%)	+	NA	Inmuno-deprimido Sintomático Mieloma multiple LV activa
		07/06/2016 SH <sup>b</sup>	+	-	0	86/0	-	NA	
		17/10/2016 SH <sup>b</sup>	+	-	0	72/0	-	NA	
25	40	01/07/2015 SH	+	+	+ 111.6	81/8 (9.9%)	+	NA	Inmuno-deprimido Asintomático Coinfectado VIH/ <i>L. infantum</i>
		21/10/2015 SH	+	+	+ 148.8	71/18 (25.4%)	+	NA	
		21/10/2015 Mano	NA	NA	NA	25/3 (12%)	NA	+	
		21/10/2015 Antebrazo	NA	NA	NA	13/1 (7.7%)	NA	+	
	41	04/11/2015 SH	+	+	+ 608.4	105/51 (48.6%)	+	NA	
		09/12/2015 SH <sup>c</sup>	+	+	+ 48.2	99/0	-	NA	
		17/02/2016 SH	+	+	+ 1104	103/20 (19.4%)	+	NA	
		13/04/2016 SH	+	+	+ 824	112/9 (8.0%)	+	NA	
	42	11/11/2016 SH	+	+	+ 658	56/2 (3.6%)	+	NA	
	26	50	24/04/2015 SH	+	+	+ 131.8	NR	NR	
10/06/2015 SH			+	-	0	108/0	-	NA	
21/10/2015 SH			+	-	0	100/0	-	NA	
21/10/2015 Mano			NA	NA	NA	21/0	NA	-	
21/10/2015 Antebrazo			NA	NA	NA	12/0	NA	-	
51		27/11/2015 SH	+	-	0	103/0	-	NA	
		15/06/2016 SH	+	-	0	80/0	-	NA	

XDD, xenodiagnóstico directo; SH: sangre heparinizada; TIC, test inmunocromatográfico; XDI, xenodiagnóstico indirecto; NA, no aplicable; NR, no realizado. LV, leishmaniasis visceral. <sup>a</sup>Antes del tratamiento de leishmaniasis. <sup>b</sup>Después del tratamiento de leishmaniasis. <sup>c</sup>Sangre hemolizada.

Desde el punto de vista epidemiológico es importante tener muy en cuenta que, aparte de que 2 de los 3 pacientes inmunodeprimidos estudiados en el brote fueron infectivos para los flebotomos, el 17% de los casos de leishmaniasis en el brote de Fuenlabrada está relacionado en mayor o menor medida con algún tipo

de inmunosupresión (29). Además, es esencial llamar la atención sobre el hecho de que estos pacientes no padecen enfermedades sistémicas y pueden permanecer sin tratamiento durante largos periodos de tiempo durante los que pueden ser potencialmente infectivos para los flebotomos (33).

## Donantes de sangre

### *Donantes asintomáticos seropositivos a Leishmania*

Los anticuerpos IgG anti-*Leishmania* fueron detectados en un donante, mediante IFI (título 1/160) y TIC-rK39. En un segundo donante, solo se detectaron anticuerpos mediante TIC-rK39. Los XDIIs llevados a cabo con las muestras de sangre de ambos donantes fueron negativos, siendo un total de 182 las hembras de flebotomos disecadas (Tabla 4).

### *Donantes sanos con historial de contacto con L. infantum*

Estos 6 donantes, residentes en la zona del brote de Fuenlabrada, habían tenido al menos un resultado positivo a CPA-ASL en meses anteriores, pero en el momento de la realización de los XDIIs eran CPA-ASL negativos. En estos sujetos, los XDIIs fueron de igual modo negativos. Un total de 487 hembras de flebotomos fueron disecadas (Tabla 4).

### *Donantes de sangre sanos*

Los XDIIs realizados con la sangre de 4 donantes que jamás habían estado en contacto con el parásito fueron también negativos. El número total de hembras de flebotomo disecadas fue de 334 (Tabla 4).

En el estudio realizado, se ha hecho uso por primera vez del ensayo CPA-ASL con el fin de reclutar entre los donantes de sangre los individuos asintomáticos que participaron en los estudios. Aunque se ha reportado la infección asintomática por *Leishmania* en un importante porcentaje de la población de Fuenlabrada (34), los donantes asintomáticos con una CPA-ASL positiva, incluidos los dos donantes que además tenían una serología positiva a *Leishmania*, fueron incapaces de infectar ningún flebotomo. Sin embargo, se sabe que en determinados casos *L. infantum* prevalece entre donantes de sangre asintomáticos y puede circular en su sangre de manera intermitente y en reducidas cantidades (portadores asintomáticos).

**Tabla 4. Xenodiagnóstico indirecto realizado con sangre heparinizada de donantes de sangre (N=24).**

Donante	Edad (años)	Fecha toma muestra	CPA-ASL	IFI	TIC-rK39	PCR	♀ disecadas / ♀ infectadas	XDI	Estado clínico
1	48	16/04/2015	+	-	-	-	61/0	-	Asintomático
2	61	30/06/2015	+	+	+	-	89/0	-	Asintomático seropositivo
3	43	01/07/2015	-	-	-	-	101/0	-	Sano <sup>a</sup>
4	53	02/07/2015	-	-	-	-	71/0	-	Sano <sup>a</sup>
5	42	07/07/2015	+	-	-	-	107/0	-	Asintomático
6	32	04/03/2016	-	-	-	-	58/0	-	Sano
7	47	29/03/2016	+	-	-	-	82/0	-	Asintomático
8	30	30/03/2016	-	-	-	-	76/0	-	Sano
9	54	30/03/2016	-	-	-	-	100/0	-	Sano
10	60	19/04/2016	-	-	-	-	100/0	-	Sano
11	44	11/05/2016	-	-	-	-	78/0	-	Sano <sup>a</sup>
12	32	31/05/2016	-	-	-	-	77/0	-	Sano <sup>a</sup>
13	29	04/10/2016	+	-	-	-	53/0	-	Asintomático
14	62	04/10/2016	+	-	-	-	66/0	-	Asintomático
15	55	05/10/2016	+	-	-	-	52/0	-	Asintomático
16	38	10/10/2016	+	-	-	-	96/0	-	Asintomático
17	29	17/10/2016	+	-	-	-	76/0	-	Asintomático
18	34	19/10/2016	+	-	-	-	84/0	-	Asintomático
19	34	24/10/2016	-	-	-	-	86/0	-	Sano <sup>a</sup>
20	52	26/10/2016	+	-	-	-	59/0	-	Asintomático
21	34	09/11/2016	+	-	-	-	77/0	-	Asintomático
22	49	14/12/2016	+	-	+	-	93/0	-	Asintomático seropositivo
23	45	15/02/2017	-	-	-	-	74/0	-	Sano <sup>a</sup>
24	28	22/02/2017	+	-	-	-	81/0	-	Asintomático

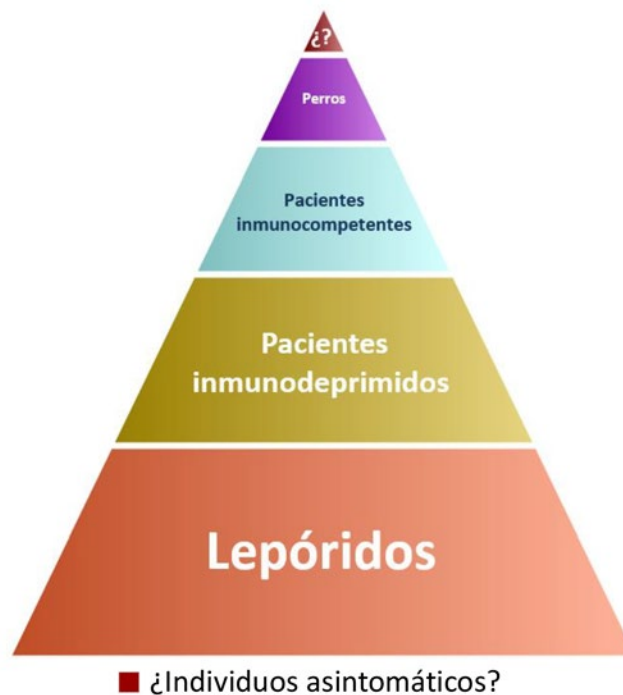
CPA, prueba de linfoproliferación; TIC, prueba inmunocromatográfica; IFI, anticuerpos frente a *Leishmania* mediante inmunofluorescencia indirecta; XDI, xenodiagnóstico indirecto; ASL, antígeno soluble de *Leishmania*. <sup>a</sup> Las extracciones previas de sangre de estos pacientes al menos habían sido en una ocasión CPA-ASL positivas.

### Donantes asintomáticos

Los XDIs realizados con la sangre de los 12 donantes, CPA-ASL positivos, fueron también negativos. En total fueron disecadas 894 hembras de flebotomos ([Tabla 4](#)).

El xenodiagnóstico es un método valioso para detectar reactividad inmune al parásito, pero su detección en los donantes de sangre del presente estudio ha podido ser transitoria, motivo por el cual los parásitos no se detectaron ni por qPCR ni por xenodiagnóstico. Hay que tener en cuenta también que una prueba celular positiva en ausencia de inmunosupresión conlleva un riesgo muy bajo de padecer una LV. Los resultados obtenidos sugieren que los individuos inmunocompetentes asintomáticos no estarían jugando un papel determinante en la transmisión de la leishmaniasis en el foco de Fuenlabrada, por lo que habría que poner el foco sobre los pacientes VIH/*L. infantum* coinfectados, con especial interés en los individuos asintomáticos (Figura 4). Que la sangre de pacientes inmunodeprimidos sea más infectiva para los flebotomos que la de sujetos inmunocompetentes es un dato bien conocido, debido a la mayor cantidad de parásitos circulantes en la sangre periférica de los primeros.

**Figura 4. Contribución de diferentes hospedadores vertebrados presentes en el área del brote de Fuenlabrada en la transmisión de la leishmaniasis (Fuente: LEM, CNM).**



## CONSIDERACIONES FINALES ACERCA DEL XENODIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS

En la realización de los xenodiagnósticos es imprescindible disponer de un laboratorio dotado de un insectario, para el mantenimiento de colonias estables de flebotomos, convenientemente equipado para el procesado de los flebotomos alimentados de sangre. Incluso la utilización de estos insectos en investigación está también condicionada por la complejidad y el alto grado de especialización que representa la cría y mantenimiento de flebotomos en el insectario. A todo ello habría que agregar que las disecciones de flebotomos, además de ser tediosas y consumir bastante tiempo, precisan de la intervención de entomólogos altamente cualificados.

Las colonias de flebotomos a utilizar en aquellos XDDs que involucren a personas deben ser mantenidas en condiciones cerradas, es decir, no deben haber tenido exposición directa a otros animales, siendo únicamente mantenidas con una solución de azúcar estéril hasta la realización de los ensayos de xenodiagnóstico. Además, deben estar certificadas, mediante PCR u otros métodos cuantitativos altamente sensibles, como puede ser la secuenciación de ARN, de encontrarse libres de arbovirus que pudieran haber sido transmitidos transováricamente.

Como herramienta estándar, el XDD posiblemente sea el método más ético de toma de muestras a seres humanos (1), sobre todo si es comparado, entre otros, con métodos como la extracción convencional de sangre periférica o el aspirado de médula ósea. El procedimiento tan solo puede dar lugar a alguna reacción alérgica excepcional, malestar pasajero, hinchazón, enrojecimiento y calor o picazón en los puntos de las picaduras. Los riesgos para los voluntarios expuestos a las picaduras de flebotomos son pues mínimos y éticamente aceptables. Debemos tener muy en cuenta también que una parte muy importante de la población de áreas endémicas de leishmaniasis se encuentra habitualmente expuesta a frecuentes picaduras de flebotomos, dentro y fuera de sus viviendas. En cualquier caso, es imprescindible el correspondiente consentimiento informado de los individuos que accedan a participar en los estudios de xenodiagnóstico.

Un xenodiagnóstico positivo es una prueba innegable de infección por *L. infantum* en un hospedador vertebrado, pero un resultado negativo no descartaría en absoluto la presencia del parásito. La técnica es muy específica, pero relativamente sensible ya que dependerá del hospedador y de otros factores relacionados con el vector. Con todo y con eso, se trata de una metodología que ofrece muchas más ventajas que inconvenientes y que, hoy por hoy, es la técnica de referencia en los estudios de infectividad sobre los flebotomos de vertebrados infectados por *L. infantum*.

Si bien la parasitemia sanguínea parece perfilarse como el predictor más fiable de transmisión del parásito a los flebotomos, la contribución relativa de sangre *versus* piel en dicha transmisión aún está pendiente de aclaración de forma concluyente mediante la utilización de los diferentes métodos de xenodiagnóstico.

El conjunto de consideraciones mencionadas condicionaría en cierto modo el uso del xenodiagnóstico entre la población, sobre todo en estudios a gran escala. Por último, hay que tener en cuenta que además de las dificultades aludidas, y una vez obtenida la correspondiente aprobación del comité bioético, todavía nos podemos encontrar con un último obstáculo derivado del posible rechazo de una parte de la población invitada a participar en los ensayos de XDD, aspecto que se puede solventar si son sustituidos por ensayos de XDI.

## CONCLUSIONES

- El xenodiagnóstico posee el potencial de contribuir de manera significativa en la implementación de las medidas a emplear a largo plazo en la eliminación de la LV ya que da respuesta a preguntas básicas en la epidemiología de la LV y aporta evidencia científica irrefutable sobre el potencial de transmisión de diferentes reservorios humanos o animales.
- Se demuestra por vez primera la capacidad de liebres (*L. granatensis*) y conejos de campo (*O. cuniculus*), aparentemente sanos, de infectar con *L. infantum* hembras de *P. perniciosus* que se alimenten de ellos, confirmándose el papel de estos leporidos como reservorios del parásito.
- Se constata la existencia de un intenso ciclo de transmisión del parásito entre la fauna silvestre de la zona del brote, esencialmente liebres y conejos.
- Liebres y conejos de campo mantienen su capacidad infectiva entre un periodo de transmisión y el siguiente, ya que son capaces de transmitir *L. infantum* a los flebotomos durante el invierno.
- La contribución potencial del ser humano a la transmisión de la leishmaniasis en el foco de Fuenlabrada se centra, por un lado, en pacientes inmunocompetentes con LV activa que ocuparían una posición discreta en la pirámide de transmisión ([Figura 4](#)) pues tan sólo algunos de ellos serían capaces de transmitir el parásito a un número reducido de flebotomos. Por otro lado, la atención se debe fijar en los pacientes inmunodeprimidos, en especial en los sujetos VIH/*L. infantum* coinfectados asintomáticos, ya que pueden infectar fácilmente a los flebotomos durante largos periodos de tiempo, incluso estando bajo profilaxis secundaria de leishmaniasis.

- El genotipo de *L. infantum* identificado en muestras clínicas de origen humano, en flebotomos capturados en el parque Bosquesur y en lepóridos silvestres es idéntico (genotipo «Lombardi»).
- La información aportada a raíz de los estudios realizados en la zona del brote ha permitido orientar de manera determinante la elección de las medidas más eficaces a incorporar en los programas de control de la enfermedad.

## REFERENCIAS

1. Singh OP, Hasker E, Boelaert M, Sacks D, Sundar S. Xenodiagnosis to address key questions in visceral leishmaniasis control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14: e0008363.
2. Brumpt E. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infection parasitaires et in particulier à la trypanosome de Chagas. *Bull Soc Pathol Exot.* 1914; 77: 706-710.
3. Meiser CK, Schaub GA. Chapter 12. Xenodiagnosis. In H. Mehlhorn (ed.), *Nature Helps, Parasitology Research Monographs 1*, doi: [10.1007/978-3-642-19382-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-19382-8_12), Springer-Verlag 2011 Berlín Heidelberg.
4. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88: 491-493.
5. da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, Williams P, Melo MN. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J.* 2007; 174: 636-643.
6. Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, Franca-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol.* 2007; 147: 67-76.
7. Laurenti MD, Rossi CN, Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, Pimenta PF, Marcondes M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Vet Parasitol.* 2013; 196: 296-300.

8. Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol.* 1987; 1: 339-342.
9. Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J, Rodríguez F, y col. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol.* 1994; 88: 371-378.
10. Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frezard F, Michalick MS. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 2564-2572.
11. Miró G, Gálvez R, Fraile C, Descalzo MA, Molina R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit Vectors.* 2011; 4: 52.
12. Molina R, Alvar J. A simple protocol for the indirect xenodiagnosis of *Leishmania infantum* in the blood of HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol.* 1996; 90: 639-640.
13. Molina R, Lohse JM, Pulido F, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 51-53.
14. Molina R, Cañavate C, Cercenado E, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS.* 1994; 8: 277-279.
15. Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, Pérez M, Walker J, Travi BL, Saravia NG. Evidence for *Leishmania (Viannia)* parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis.* 2006; 194: 503-511.
16. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009: 1-20.
17. 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.

18. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol.* 2012; 190: 268-271.
19. González E, Jiménez M, Hernández S, Martín-Martín I, Molina R. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis of Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasit Vectors* 2017, 10:368.
20. Molina R, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Jiménez M. 2017. Xenodiagnóstico de la leishmaniosis: implicación de los lepóridos en el ciclo selvático de *Leishmania infantum* en Bosquesur. En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: el papel de las liebres y los conejos como reservorios. Edita: Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid. ISBN: 978-84-451-3625-6
21. Molina R, Jiménez M, García-Martínez J, San-Martín JV, Carrillo E, Moreno J, Alves F, Alvar J. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoir of visceral leishmaniasis in the Mediterranean context. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020, 14: e0008253.
22. Molina R. Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res Rev Parasitol.* 1991; 51: 87-89.
23. Molina R, Ghosh D, Carrillo E, Monnerat S, Bern C, Mondal D, Alvar J. Infectivity of Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis patients to sand flies: revisiting a proof of concept in the context of the Kala-azar Elimination Program in the Indian subcontinent. *Clin Infect Dis.* 2017;65:150-153.
23. Suárez-Rodríguez B, Isidoro-Fernández B, Santos-Sanz S, Sierra-Moros MJ, Molina-Moreno R, Astray-Mochales J, Amela-Heras C. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Pública.* 2012; 86: 555-564.
24. Vilas F, Carpintero J, Sevilla S, Martínez A, Ordobás M, Bernal J, Díaz R, Iriso A, Sevillano O, Escacena C, De La Fuente S, Arce A, Estirado A, Frutos J, Fúster F. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental. *Prof Vet.* 2012; 17: 6-15.
25. Moreno I, Álvarez J, García N, de la Fuente S, Martínez I, Marino E, Toraño A, Goyache J, Vilas F, Domínguez L, Domínguez M. Detection

- of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet Parasitol.* 2014; 199: 264-267.
26. Martín-Martín I, Molina R, Rohousova I, Drahota J, Volf P, Jiménez M. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. *Vet Parasitol.* 2014; 202: 207-216.
  27. Ruiz-Fons F, Ferroglio E, Gortázar C. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro Surveill.* 2013; 18(30): pii=20541.
  28. Chicharro C, Llanes-Acevedo I, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013; 18: 20545.
  29. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid. Informe sobre leishmaniasis 2017; 11(23):103-106
  30. Molina R, Cañavate C, Cercenado E, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS.* 1994; 8: 277-279.
  31. Costa CHN, Gomes RBB, Silva MRB, Garcez LM, Ramos PKS, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis.* 2000; 182: 997-1000.
  32. Molina R, Lohse JM, Pulido F, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60:51-53
  33. Bourgeois N, Bastien P, Reynes J, Makinson A, Rouanet I, Lachaud L. «Active chronic visceral leishmaniasis» in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med.* 2010; 11: 670-673
  34. Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Nieto J, Sánchez C, Ortega S, Estirado A, Latasa Zamalloa P, Sanz JC, García-Comas L, Ordobás M, Moreno J. Prevalence of asymptomatic *Leishmania* infection and associated risk factors, after an outbreak in the south-western Madrid region, Spain, 2015. *Euro Surveill.* 2019; 24:1800379.

## CAPÍTULO 11

# Saliva de los flebotomos: aplicación práctica al estudio del brote

Inés Martín Martín<sup>1</sup>, Maribel Jiménez<sup>1,2</sup>, Ricardo Molina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Entomología Médica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis.

<sup>2</sup> CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

## INTRODUCCIÓN

La saliva de los flebotomos, contenida en el lumen de las glándulas salivales, consiste en una mezcla de sustancias de diversa naturaleza, fundamentalmente de origen proteico, con una gran proporción de glicoproteínas, además de purinas (1,2). Muchas de estas proteínas únicamente se han identificado en la saliva de los insectos hematófagos y algunas de ellas presentan especificidad a nivel de género o subgénero. Las glándulas salivales son los órganos responsables de la producción de saliva, un fluido heterogéneo compuesto por una variedad de sustancias que es inoculado a través de la piel de los mamíferos cuando los insectos intentan alimentarse de estos. La saliva de los insectos hematófagos además de lubricar, limpiar las piezas bucales y ayudar en la digestión de azúcares y sangre, contiene una serie de sustancias bioactivas que modifican la respuesta homeostática e inmune del hospedador en el lugar de la picadura para poder asegurar el éxito de la ingurgitación de sangre (3). Concretamente, durante la hematofagia, los flebotomos tienen que hacer frente a los tres grandes eventos de la hemostasia: agregación plaquetaria, vasoconstricción y coagulación sanguínea, para lo que inyectan la saliva en el lugar de la picadura, contrarrestando así estos efectos (4,5). De ahí, que la saliva de los flebotomos, al igual que otros artrópodos hematófagos, contiene potentes inhibidores de la agregación plaquetaria, vasodilatadores y anticoagulantes (6-9).

## INMUNOLOGÍA DE LA SALIVA

La saliva también actúa a nivel de la modulación del sistema inmune en el lugar de la picadura, para lo que cuenta con componentes inmunosupresores que

disminuyen la inflamación y la sensación de dolor en el hospedador (10). No es sorprendente que la saliva de los artrópodos hematófagos, al estar compuesta por una elevada cantidad de proteínas de diversa naturaleza, posea propiedades inmunogénicas e inmunomoduladoras sobre los hospedadores vertebrados. Estas interacciones saliva-hospedador no son iguales para todos los artrópodos y están altamente relacionadas con los mecanismos y la duración de la hematofagia. Concretamente, en el caso de algunas garrapatas, al permanecer sobre el hospedador durante prolongados periodos de tiempo, la combinación de la respuesta inmune humoral y celular del hospedador a las proteínas salivales puede mediar el fenómeno de rechazo de la garrapata, circunstancia que va en detrimento del éxito en la alimentación sanguínea. Sin embargo, en el caso de los flebotomos, la interacción con el hospedador es mucho más breve, de minutos, y la respuesta inmune frente a la saliva puede incluso representar una ventaja para el flebotomo, favoreciendo la succión de la sangre (11).

La saliva de los flebotomos desencadena en el hospedador una respuesta inmune de tipo humoral con producción de anticuerpos específicos frente a las proteínas de la saliva. Esta respuesta de anticuerpos de tipo IgG ha sido detectada tanto en situaciones de exposición experimental a la saliva de los flebotomos (12-22) como en hospedadores residentes en zonas endémicas (16,18,23-30).

La saliva produce una respuesta inmune celular de hipersensibilidad retardada (DTH), caracterizada por la infiltración de células proinflamatorias (neutrófilos, eosinófilos y macrófagos) en el lugar de la picadura, que puede persistir hasta 48 h (12,17,31,32).

Paradójicamente, los flebotomos aprovechan esta respuesta inmune del hospedador para alimentarse de él más rápidamente, ya que el flujo sanguíneo es mayor en lugares de la piel que presentan una respuesta DTH (11). Únicamente algunas de las moléculas de la saliva son responsables de la inducción de la respuesta DTH y, además, la respuesta producida por esas moléculas se rige por factores genéticos del hospedador (11,14,33).

A veces los microorganismos transmitidos por vectores pueden alojarse en las glándulas salivales y, por tanto, la vía de acceso al hospedador vertebrado tiene lugar a través del conducto salival (*Plasmodium* spp., *Trypanosoma brucei*, diversos arbovirus y especies de *Borrelia* y *Rickettsia*). La saliva juega en estos casos un papel crucial, ya que los patógenos son inoculados embebidos en ella (3). Por el contrario, en el caso de *Leishmania* los parásitos proceden del tubo digestivo y son depositados en un lugar de la piel sustancialmente modificado por la saliva del vector (34).

En un primer contacto, la saliva de los flebotomos favorece el establecimiento y progreso de la infección de *Leishmania* spp. (35). El efecto potenciador de la infección de *Leishmania* spp. producido por la saliva de los flebotomos se debe a sus propiedades antihemostáticas e inmunomoduladoras. En *Lutzomyia longipalpis*, dichos efectos se han atribuido al maxadilano, el vasodilatador de origen biológico más potente descrito hasta la fecha, pues es capaz de exacerbar la infección por *Leishmania major* en la misma medida que el extracto salival completo (36). También se ha observado que la saliva de *L. longipalpis* induce la apoptosis en neutrófilos, derivando en un incremento de la carga parasitaria (37). Estudios posteriores con la saliva de flebotomos del Viejo Mundo apoyan las observaciones realizadas por Titus y Ribeiro en 1988. La infección por *L. major* también se ve exacerbada en presencia de la saliva de su vector natural, *Phlebotomus papatasi* (12). Dada la ausencia de maxadilano en la saliva de flebotomos del Viejo Mundo, se ha sugerido que la adenosina y el AMP juegan un papel importante favoreciendo la infección en este modelo (38,39).

Otras enzimas como la hialuronidasa y endonucleasa, presentes en la saliva de *Lutzomyia* y *Phlebotomus* también están involucradas en la diseminación parasitaria ya que la inyección en ratones de promastigotes de *L. major* en presencia de estas proteínas produce lesiones de mayor severidad que los animales inoculados únicamente con promastigotes (40-42). Además, la inmunización frente a estas proteínas se traduce en una protección parcial del desarrollo de lesiones de leishmaniosis cutánea.

## **LAS PROTEÍNAS SALIVALES COMO CANDIDATOS VACUNALES FRENTE A LA LEISHMANIOSIS**

La exposición previa a la saliva de diversos artrópodos confiere cierta protección frente a la infección de los patógenos transmitidos por ellos. A finales del siglo XX ya se había demostrado que la exposición a las picaduras de *Dermacentor andersoni*, *Ixodes scapularis* y *Rhipicephalus appendiculatus* no infectados protegían a los animales de experimentación frente a una posterior infección con *Franciscella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* y el virus Thogoto, respectivamente (43-46).

En flebotomos, la exposición de ratones, cricetos o perros a la saliva, bien a través de las picaduras de hembras no infectadas o a través de la inoculación de extracto salival a nivel dérmico, confiere, en la mayoría de los casos, protección frente a la infección por *Leishmania* spp.

Para explicar esta protección han planteado dos hipótesis, no excluyentes, la primera atribuye el efecto de protección a los anticuerpos antisaliva que neutralizan los

componentes salivales responsables del agravamiento de la infección (12,36,42,47). Los niveles de anticuerpos antisaliva se correlacionan con la aparición de una inmunidad protectora frente a la infección de *Leishmania* spp. (48). Sin embargo, el papel protector de los anticuerpos antisaliva ha sido ampliamente cuestionado, ya que la incidencia de la leishmaniasis sigue siendo elevada a pesar de la constante exposición de la población a las picaduras no infectivas en zonas endémicas y la consecuente generación de anticuerpos en estas poblaciones (16,49). La segunda hipótesis, más aceptada actualmente, establece que la protección es debida a la respuesta celular de tipo DTH, con incremento de niveles de INF- $\gamma$  e IL-12 y reducción de IL-4 en el lugar de la picadura, promoviendo un ambiente inhóspito para la supervivencia del parásito. Estos parámetros son indicadores de la activación de los macrófagos y la temprana destrucción de *Leishmania*, además de la polarización hacia una respuesta Th1 a nivel dérmico (14,33,50-55).

En un primer contacto con la saliva se produce un incremento de citoquinas Th2 (fundamentalmente IL-4) por parte de las células epidérmicas. En condiciones de preexposición a la saliva, tras una nueva picadura, esta inclinación hacia una respuesta Th2 es anulada (12).

Actualmente se están explorando diversas proteínas salivales de flebotomos como candidatos vacunales frente a la leishmaniasis con resultados prometedores. A día de hoy, se han testado algunos antígenos salivales usando modelos de ratón, cricetos, perro e incluso primate no humano (42,54-60). En este sentido, el desarrollo de vacunas que bloqueen la transmisión avanza a grandes pasos y ya existe una vacuna frente a diversas arbovirosis que contiene cuatro péptidos salivales de mosquitos y que se encuentra en ensayo clínico de fase I con resultados prometedores de tolerancia e inmunogenicidad (61,62).

## **LAS PROTEÍNAS SALIVALES COMO MARCADORES DE EXPOSICIÓN A LA PICADURA DE FLEBOTOMOS**

El desarrollo de anticuerpos frente a la saliva de los artrópodos hematófagos es específicamente dependiente de la exposición a estos. La correlación entre los niveles de anticuerpos de tipo IgG antisaliva y la exposición a los artrópodos se evidenció por primera vez con sueros de campesinos que habían estado en contacto con las picaduras de *Ixodes damini* en New Jersey (63). Posteriormente, otros estudios serológicos han puesto de manifiesto la cinética estacional de estos anticuerpos coincidente con el periodo de actividad de los artrópodos (63-65).

Por tanto, los anticuerpos antisaliva de los artrópodos podrían ser de utilidad como indicadores de la exposición a estos. Esta herramienta es de gran interés en estudios epidemiológicos, ya que de una manera sencilla arroja información complementaria a las encuestas entomológicas. Así, no sólo conocemos la densidad de insectos en una zona, sino el nivel de exposición a las picaduras al que los habitantes o reservorios están sometidos. Existen estudios que avalan el potencial de esta novedosa metodología como una herramienta útil para determinar la eficacia de campañas de lucha antivectorial. La disminución de los niveles de anticuerpos antisaliva en una población, tras la incorporación de medidas antivectoriales, implicaría un éxito en dicha campaña, tal y como ha ocurrido en Nepal o Angola tras el uso de mosquiteras impregnadas con insecticida en zonas endémicas de leishmaniosis y malaria, respectivamente (66,67). También se ha puesto de manifiesto la utilidad de los gallos como animales centinela para monitorizar la exposición a los flebotomos, ya que estas aves también desarrollan anticuerpos específicos (68), tal y como se ha realizado en programas de control de virus transmitidos por culícidos en Estados Unidos (69).

Esta metodología se ha utilizado en algunas zonas endémicas de Brasil, India, o Portugal para estimar la exposición de humanos a las picaduras de *L. longipalpis*, *Phlebotomus argentipes* o *Phlebotomus perniciosus* respectivamente (24,26,27,30,70,71) dando buenos resultados al trabajar con el homogeneizado de la saliva como antígeno. La dificultad en la obtención del antígeno salival mediante disección y la diversidad de la saliva, inter e intraespecífica, ha hecho que, se tienda a la utilización de las proteínas recombinantes de la saliva como marcadores más concretos (26,68,72).

Los anticuerpos antisaliva están siendo utilizados también para medir la exposición de humanos o animales domésticos a diferentes vectores tales como mosquitos, garrapatas, mosca tse-tse, simúlidos o triatominos (73-77).

## **APLICACIÓN DEL ESTUDIO DE LA SALIVA AL ESTUDIO DEL BROTE DE LEISHMANIOSIS DE LA COMUNIDAD DE MADRID**

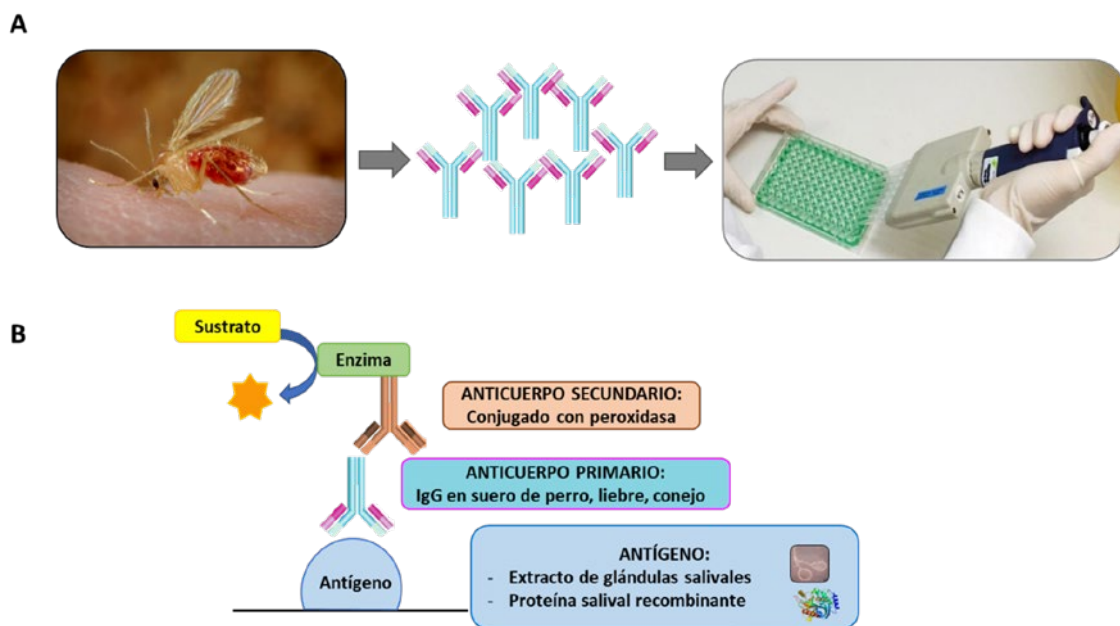
En el Suroeste de la Comunidad de Madrid está teniendo lugar el mayor brote de leishmaniasis visceral humana de Europa (78). Desde 2009 se ha producido un incremento sustancial de la tasa de incidencia de la enfermedad que tras enérgicas medidas de control frente al vector, reservorios y manejo de casos clínicos, la incidencia se ha logrado rebajar aunque se sigue encontrando por encima de valores anteriores al inicio del brote. En este brote singular, la seroprevalencia de *Leishmania* spp. en perros, el principal reservorio de *Leishmania infantum* en la cuenca mediterránea, se situaba por debajo de la media de la Comunidad de Madrid (79,80), por lo que

se procedió a estudiar otros posibles reservorios que pudieran estar implicados en el brote. Las liebres y los conejos presentaron prevalencias de infección muy elevadas (81) y han demostrado ser infectivos para los flebotomos en estudios de xenodiagnóstico (82,83). Toda esta información ha puesto de manifiesto la existencia de un ciclo de transmisión silvestre independiente del doméstico tradicional, y vinculado a la periferia urbana (78,84). En estudios entomológicos se ha determinado que *P. perniciosus* es el vector implicado en el brote, encontrándose en densidades muy elevadas y se han detectado ADN de *Leishmania* en los flebotomos en valores muy elevados (85,86).

Por tanto, en este contexto del brote de leishmaniasis en la Comunidad de Madrid nos propusimos por un lado estudiar, mediante ELISA, la exposición de las liebres, conejos y perros a las picaduras de *P. perniciosus* (Figura 1), determinar mediante *Western Blot* (WB) la inmunogenicidad de las proteínas salivales usando sueros de liebres y conejos y por último evaluar las proteínas recombinantes como marcadores de exposición en animales silvestres.

**Figura 1. Determinación de anticuerpos antisaliva mediante ELISA indirecto.**

**Panel A:** Cuando un flebotomo se alimenta de un vertebrado, éste desarrolla anticuerpos frente a las proteínas de la saliva de los flebotomos. La determinación del nivel de anticuerpos IgG en el suero de los vertebrados nos permite conocer el nivel de exposición de los vertebrados a las picaduras de los flebotomos. **Panel B:** ELISA indirecto para la determinación de niveles de IgG frente al extracto salival o proteínas salivales recombinantes. Fuente: CDC/Frank Collins (Fotografía de *Phlebotomus papatasi*) y UEM/ISCIII/Inés Martín Martín (fotografía de la técnica ELISA).



En la Unidad de Entomología Médica del Instituto de Salud Carlos III (UEM) se ha descrito, por primera vez, el mapa proteómico de la saliva de este insecto combinando las técnicas de electroforesis bidimensional y espectroscopía de masas y, se han identificado las proteínas antigénicas para diversos animales de laboratorio (87). Así mismo, se estudió la cinética que siguen los anticuerpos antisaliva en ratones y en conejos expuestos experimentalmente a las picaduras de *P. perniciosus*. Se construyó una genoteca de ADNc a partir de las glándulas salivales de *P. perniciosus*, y se identificaron diversas moléculas inmunogénicas que, posteriormente, se han clonado, expresado y purificado. Las proteínas recombinantes producidas se han evaluado como marcadores de exposición a las picaduras de los flebotomos (88).

Una vez estandarizadas las condiciones de ELISA *in house* (Tabla 1), se estudió la exposición mediante la medida de los niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus* presentes en el suero de diferentes reservorios: el perro, como el reservorio doméstico clásico en la cuenca mediterránea; la liebre y el conejo como reservorios silvestres recientemente descritos (89).

**Tabla 1. Condiciones del ELISA *in house* para la detección de anticuerpos antisaliva establecidas en la UEM (ISCIII).**

Protocolo de ELISA <i>in house</i>	
<b>Tapizado</b>	Incubación durante toda la noche a 4 °C de 1/2 glándula salival por pocillo en 100 µl de solución carbonato/bicarbonato a 0,02 M, pH 9,5.
<b>Lavados</b>	2 lavados de 100 µl con PBS-Tween al 0,05%
<b>Bloqueo</b>	Leche desnatada (BioRad <sup>®</sup> ) al 6% en PBS-Tween al 0,05%, durante 1 h a 37 °C
<b>Lavados</b>	3 lavados de 100 µl con PBS-Tween al 0,05%.
<b>Sueros</b>	Incubación con sueros, diluidos a 1/50 en leche al 2%, en PBS-Tween al 0,05%, durante 3 h a 37 °C
<b>Lavados</b>	4 lavados con 100 µl de PBS-Tween al 0,05%
<b>Conjugado</b>	Incubación con el correspondiente anticuerpo, conjugado con peroxidasa diluido en 100 µl de PBS-Tween al 0,05% (anti IgG de perro Bethyl Laboratories <sup>®</sup> , dilución 1:1.000, anti IgG de conejo AbD Serotec <sup>®</sup> , dilución 1:2.500) durante 1 h a 37 °C
<b>Lavados</b>	6 lavados con 100 µl de PBS-Tween al 0,05%
<b>Revelado</b>	5-10 min de incubación a temperatura ambiente con 100 µl de OPD (0,5 mg/ml) en solución citrato/fosfato, pH 5,5 y 0,001% (v/v) de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , al 30%
<b>Parada</b>	100 µl de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10%
<b>Lectura</b>	Las lecturas de absorbancia se realizaron a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific <sup>®</sup> )

## Exposición de liebres y conejos a las picaduras de los flebotomos

Se utilizaron sueros de 59 liebres (*Lepus granatensis*) y 13 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) capturados durante el otoño-invierno de 2011/2012 en el parque cercano al brote de leishmaniosis humana del suroeste de Madrid. Se usaron además otros 8 conejos capturados en el invierno de 2013. Dichos animales fueron capturados por la Comunidad de Madrid en el marco del programa de eliminación de posibles reservorios de *Leishmania* spp. en esta zona.

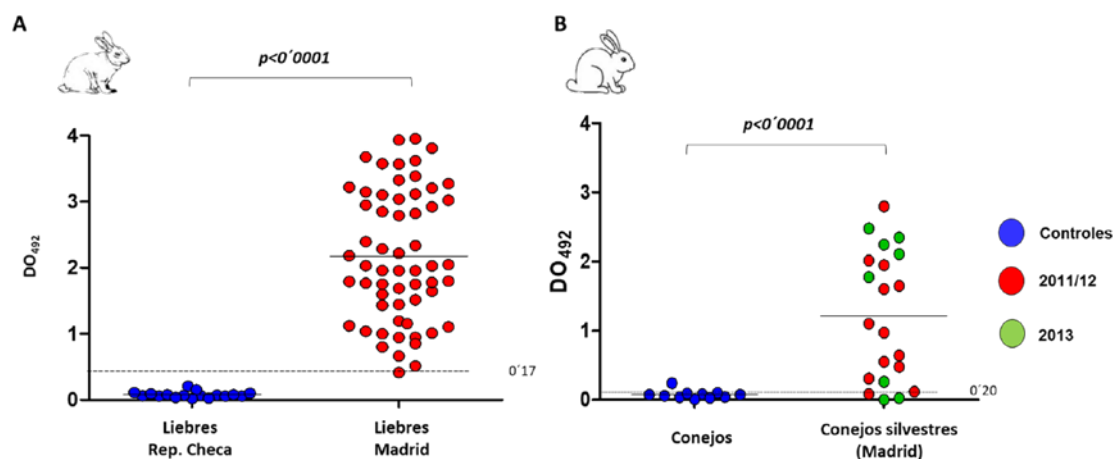
Como muestras de animales no expuestos a los flebotomos se emplearon 18 sueros de liebres (*Lepus europaeus*) procedentes de la República Checa, donde hasta la fecha no se ha reportado la presencia de flebotomos. Como control positivo de la exposición a los flebotomos se utilizó el suero de un conejo experimentalmente expuesto a la picadura de *P. perniciosus* de Murcia. Ambos sueros control fueron suministrados por el Laboratorio de Biología de Vectores de *Charles University in Prague*, República Checa LBV (CUNI).

El estudio de la exposición de los animales se realizó mediante la técnica de ELISA *in house* optimizada en la UEM (ISCIII) y se comparó con los resultados de la técnica desarrollada en el LBV (CUNI), obteniéndose datos altamente concordantes. Utilizando la misma batería de sueros de liebres y conejos, esta correlación alcanzó valores de  $r=0,9676$  y  $r=0,8681$ , respectivamente ( $p<0,0001$  en ambos casos).

Todos los sueros de las liebres capturadas en la zona cercana al brote de leishmaniosis humana de la CM ( $n=59$ ) mostraron niveles de anticuerpos IgG antisaliva significativamente superiores ( $p<0,0001$ ) a los niveles de IgG presentes en los sueros de las liebres de una zona no endémica (República Checa), tal y como se muestra en la [Figura 2A](#). El punto de corte de  $DO_{492}=0,17$  se estableció calculando la media de las absorbancias de los controles negativos ( $n=18$ ), más dos desviaciones estándar. Se observó una distribución muy heterogénea de los niveles de anticuerpos IgG antisaliva, desde valores muy bajos ( $DO_{492}=0,42$ ) hasta valores muy elevados ( $DO_{492}=3,95$ ) ([Figura 2A](#)) lo que sugiere diferencias en el grado de la exposición a los flebotomos.

La mayoría de los sueros de conejos silvestres capturados en la Comunidad de Madrid (81%) mostraron niveles de anticuerpos antisaliva significativamente superiores ( $p<0,0001$ ) al punto de corte establecido con 11 sueros negativos procedentes de conejos mantenidos en el estabulario del ISCIII ( $DO_{492}=0,20$ ). Los valores de absorbancia fueron más variables que los detectados en liebres, sin embargo, los niveles máximos de  $DO_{492}$  fueron menores en conejos.

**Figura 2. Niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus* presentes en los sueros de liebres (Panel A) y conejos (Panel B).** (●) Sueros de liebres no expuestas a las picaduras. (●): Sueros de los conejos capturados en la Comunidad de Madrid durante 2011/2012. (●): Sueros de los conejos capturados durante 2013. (\*\*\*) :  $p < 0,0001$ .



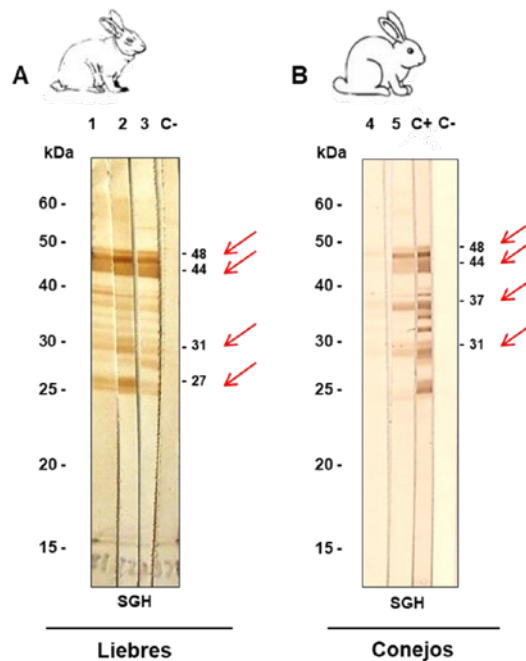
En función del nivel de anticuerpos obtenidos por ELISA se seleccionaron sueros de liebres y conejos para ser estudiados mediante *WB* con el extracto salival. Se determinaron así los antígenos responsables de la inmunogenicidad observada mediante ELISA. Los sueros de los animales silvestres reconocieron diferentes proteínas de la saliva, con una intensidad variable que presumiblemente se corresponden con proteínas amarillas, apirinas, similares a ParSP25 y relacionadas con D7 (Figura 3).

Así, nuestros resultados de niveles de anticuerpos antisaliva en liebres y conejos concuerdan con la determinación de las preferencias alimentarias de los flebotomos capturados en la zona (85,86,90). Ambos estudios son complementarios y permiten afirmar que estos lagomorfos son una importante fuente de alimentación para los flebotomos del área del brote y, por tanto, están contribuyendo al mantenimiento de elevadas densidades de flebotomos en esta zona.

Los resultados obtenidos en los estudios realizados demostraron que, tanto los animales domésticos como los silvestres, estuvieron expuestos a las picaduras de *P. perniciosus*. Estos datos representaron las primeras determinaciones de niveles de anticuerpos antisaliva en reservorios vertebrados en España (91), a las que se han sumado posteriores estudios en Cataluña, Mallorca y Murcia (92-94). De forma general suponen la detección por primera y única vez de anticuerpos antisaliva en el suero de lepóridos silvestres, por lo que no ha sido posible la comparación con datos previos de exposición de animales. En particular, los resultados indican que todas las liebres y la mayoría de los conejos silvestres (86%) estudiados estuvieron expuestos a las picaduras de *P. perniciosus*. El amplio rango de niveles de anticuerpos

antisaliva detectados en los sueros de liebres y conejos sugiere un diferente grado de exposición de los animales a las picaduras.

**Figura 3. Reconocimiento de las proteínas de la saliva de *P. perniciosus* (SGH) por los sueros de los lepóridos, mediante WB. A)** Sueros de liebres (carriles 1-3). (C-) Control negativo (suero de una liebre de zona no endémica, República Checa). **B)** Sueros de conejos (carriles 4-5). (C+): Control positivo de exposición (suero de un conejo experimentalmente expuesto a la picadura de *P. perniciosus*), (C-): Control negativo (suero de un conejo de estabulario).



Aunque se detectaron niveles de anticuerpos antisaliva superiores en liebres que en conejos no se puede concluir que exista una mayor exposición de las liebres a las picaduras de los flebotomos, pues no se puede descartar una diferente afinidad/reactividad del conjugado anti IgG de conejo con las IgG de liebre. Tampoco se puede descartar una diferente antigenicidad de las proteínas salivales para estos dos vertebrados, tal y como se observó en los experimentos de detección de antígenos salivales usando sueros de ambos animales, mediante *WB*, donde la banda de 27 kDa fue exclusivamente reconocida por los sueros de liebres y la banda de 37 kDa por los sueros de conejos ([Figura 3](#)). Las liebres y los conejos, a pesar de pertenecer a la misma familia Leporidae presentan diferencias notables en su respuesta inmune ([95](#)), por lo que podrían responder de una manera distinta a la infección por *Leishmania* spp.

Por otro lado, observaciones derivadas del trabajo con flebotomos colonizados han demostrado que los conejos son una importante fuente de alimentación

sanguínea para las especies del subgénero *Larroussi* (96-98). Estos datos han sido confirmados por los elevados porcentajes de alimentación obtenidos en los experimentos de inmunización de conejos a través de la picadura de *P. perniciosus*. La productividad, entendida como la relación entre el número de huevos puestos y el número de adultos eclosionados, es mayor cuando se alimentan de sangre de conejos que de otros vertebrados, tales como cricetos, perros o humanos (96). La combinación de los elevados niveles de anticuerpos antisaliva observados en conejos y la determinación de las preferencias alimentarias de los flebotomos capturados en la zona (86), nos permitieron concluir que estos lagomorfos son una importante fuente de alimentación para los flebotomos del área del brote y, por tanto, están contribuyendo al mantenimiento de elevadas densidades de flebotomos en las cercanías de áreas urbanas densamente pobladas donde está teniendo lugar el brote. Todos estos datos refuerzan la hipótesis sobre la posible implicación de los lepóridos como reservorios activos y la existencia de un ciclo silvestre en este escenario, independiente del doméstico (82,99).

Un dato interesante es que todas las liebres y los conejos fueron capturados durante el invierno. Por tanto, los niveles elevados de anticuerpos antisaliva detectados en el suero de los lepóridos se mantuvieron al menos tres meses, desde finales de octubre del año anterior, final de la temporada de actividad de *P. perniciosus* en la Comunidad de Madrid (100) hasta el momento de la captura (enero-marzo). Es importante conocer durante cuánto tiempo los anticuerpos antisaliva pueden permanecer detectables en el suero de los animales. Existen pocos trabajos en los que se haya evaluado la cinética de los anticuerpos antisaliva y estos se han centrado en ratones, perros y humanos (18-21,70). Nuestro grupo de investigación ha aportado datos sobre la cinética de los anticuerpos antisaliva en conejos inmunizados experimentalmente a través de las picaduras de *P. perniciosus* (101), que permitieron afirmar que al menos una parte de la respuesta de anticuerpos podría persistir en el suero de los animales silvestres desde el final del periodo de actividad de los flebotomos (de octubre a noviembre), hasta el inicio del siguiente (entre mayo y junio), confirmando los hallazgos observados de la elevada respuesta antisaliva en los lepóridos de la zona del brote de la Comunidad de Madrid capturados durante el invierno.

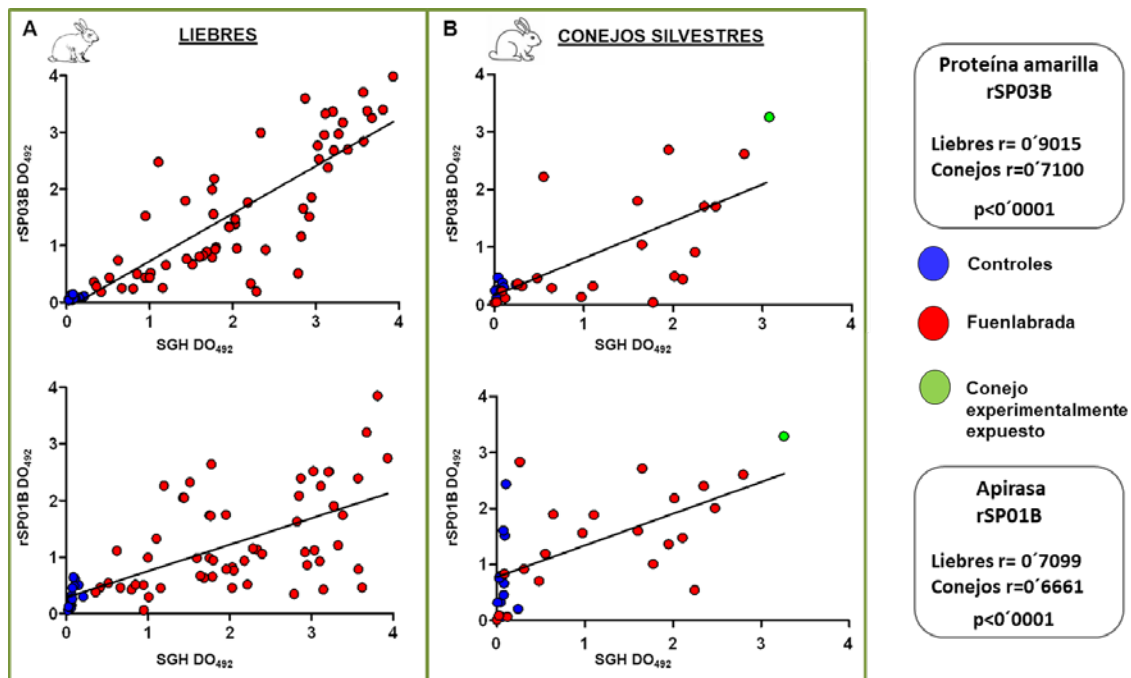
Las determinaciones sobre la persistencia de los anticuerpos antisaliva son de vital importancia para poder establecer el momento adecuado para evaluar el resultado de las campañas de control vectorial. Por lo tanto, se hace necesario incidir en estos estudios ya que se desconoce la influencia de la pauta de exposición en la posterior cinética de los anticuerpos antisaliva. Resulta muy complejo extrapolar una pauta de inmunización experimental a la exposición de los vertebrados a los flebotomos en la naturaleza. Por otro lado, recientes estudios han demostrado que modificacio-

nes en las pautas de exposición a las picaduras conllevan notables diferencias en el efecto protector de la saliva frente a la progresión de la leishmaniosis en un modelo murino (102), por lo que se requieren estudios más exhaustivos sobre la dinámica de los anticuerpos antisaliva con diferentes pautas de inmunización.

A lo largo de 2012, se llevaron a cabo una serie de medidas de control en el suroeste de la Comunidad de Madrid con el fin de detener la propagación de esta epidemia (103). Una forma de evaluar la eficacia de las campañas antivectoriales es constatar la reducción de la exposición de los reservorios a las picaduras de los flebotomos, tras comprobar una disminución del nivel de anticuerpos antisaliva. Esta metodología ha sido empleada para mostrar el éxito de campañas de control de mosca tse-tse, triatominos y culícidos (66, 104,105). No se encontraron diferencias entre los niveles de anticuerpos antisaliva de conejos capturados durante 2011/2012 respecto a los de 2013 ( $p=0,59$ ), es decir antes y después de la instauración de las medidas de control (Figura 2B). Esto puede deberse al bajo número de sueros empleados en esta comparación o al tiempo de evaluación, ya que quizá el periodo transcurrido entre la aplicación de las medidas de control (fundamentalmente verano) y la captura de los animales (siguiente invierno) no fuera suficiente para detectar una caída en los niveles de anticuerpos antisaliva, tal y como sugieren los resultados preliminares de la cinética de anticuerpos antisaliva en conejos expuestos experimentalmente a la picadura de *P. perniciosus* (101).

En el estudio de la exposición a la saliva de animales procedentes del brote se evaluaron también los niveles de anticuerpos frente a varias proteínas recombinantes de la saliva. Utilizamos la apirasa rSP01B, que había mostrado su utilidad como marcador de exposición a la picadura en ratones, pero no en perros, ya que los niveles de anticuerpos frente al extracto salival no se correlacionaban con los anticuerpos frente a esta proteína recombinante en ELISA (106). No obstante, en el caso de los lepóridos confirmamos una correlación positiva, estadísticamente significativa, entre los niveles de anticuerpos frente al extracto salival y la proteína recombinante rSP01B, validándose su utilización como marcador de exposición en dichos animales silvestres (Figura 4). El reconocimiento de esta proteína recombinante por los sueros de liebres y conejos silvestres fue reafirmado por WB. Estos resultados corroboran la diferencia de especificidad de la respuesta inmune frente a la saliva (16).

**Figura 4. Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG, mediante ELISA, frente al extracto salival (SGH) y a las proteínas recombinantes rSP03B y rSP01B, detectados en los sueros de los lepóridos. A) Liebres. B) Conejos.**



### Exposición de perros a las picaduras de los flebotomos

Los sueros de perros con dueño, residentes en Fuenlabrada y Leganés, se obtuvieron durante la campaña antirrábica 2012 (mayo-julio) llevada a cabo por los correspondientes ayuntamientos. De los 561 sueros de perros disponibles, se eligieron 37, de acuerdo a sus características clínico-epidemiológicas reflejadas en las fichas anotadas por los veterinarios que participaron en la campaña antirrábica. Los grupos se establecieron en función del potencial de exposición de dichos perros a la picadura de los flebotomos y se diferencian fundamentalmente en el uso de insecticidas y pernocta intra o extradomiciliaria. Los criterios de inclusión en cada grupo, así como el número total de sueros, se especifican en la [Tabla 2](#).

**Tabla 2. Clasificación de los perros seleccionados para el estudio de acuerdo a su potencial exposición a la picadura de los flebotomos.**

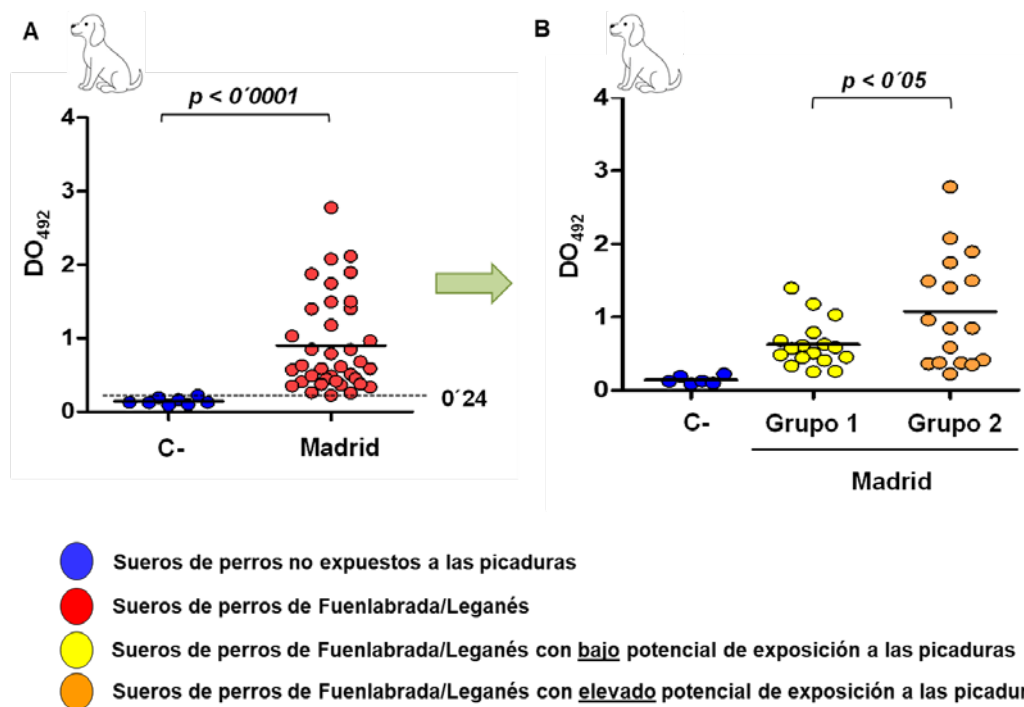
Nivel de exposición de los perros a los flebotomos	N.º de perros estudiados	Criterios de inclusión
<b>Bajo</b>	17	Edad < 2 años; clínicamente asintomáticos; uso de insecticidas tópicos; pernocta intradomiciliaria; serología a <i>Leishmania</i> negativa (inmunocromatografía rK39 e IFI); ausencia de viajes a zonas endémicas; ausencia de relación con casos de leishmaniosis humana o canina.
<b>Elevado</b>	17	Clínicamente asintomáticos; ausencia de uso de insecticidas tópicos y/o pernocta extradomiciliaria; serología a <i>Leishmania</i> negativa (inmunocromatografía rK39 e IFI).

Todos los sueros de perros con propietario, residentes en la zona de Fuenlabrada y Leganés (n=37), presentaron niveles de anticuerpos antisaliva altamente dispersos y significativamente superiores ( $p < 0,0001$ ) al punto de corte ( $DO_{492} = 0,24$ ) establecido con 6 sueros de perros no expuestos a la picadura (Figura 5). Además, comprobamos que los perros con factores de riesgo a la exposición de los flebotomos (Grupo 2, como la ausencia de uso de insecticidas o la pernocta extradomiciliaria, presentaban niveles superiores que los sueros de los perros con un riesgo de exposición teóricamente limitado.

Los perros residentes en la zona del brote de leishmaniosis de la Comunidad de Madrid presentaron niveles de anticuerpos antisaliva superiores a los de los sueros de perros controles no expuestos, demostrando su exposición a las picaduras de *P. perniciosus*. Aunque otros autores han determinado que los anticuerpos antisaliva pueden persistir en el suero de los perros hasta el siguiente periodo de actividad de los flebotomos (20), se puede asumir que al menos una parte de los niveles de anticuerpos detectados se deba a una exposición reciente ya que las muestras se recogieron entre mayo y julio. En otros estudios llevados a cabo en Italia con perros naturalmente expuestos a las picaduras de *P. perniciosus*, se observó un incremento de anticuerpos frente a la saliva durante el periodo de actividad de los flebotomos (18).

**Figura 5. Niveles de anticuerpos IgG antisaliva de *P. perniciosus* presentes en los sueros de los perros con propietario residentes en el suroeste de la Comunidad de Madrid.**

(●): Sueros de perros no expuestos a las picaduras. (●): Sueros de perros de la zona del brote  
 (●): Grupo 1: Perros con un bajo nivel de exposición a los flebotomos. (●): Grupo 2: Perros con un elevado nivel de exposición a los flebotomos.



Como era de esperar, nuestros resultados mostraron niveles menores de anticuerpos antisaliva en perros potencialmente protegidos de las picaduras de vectores (Grupo 1) que en los perros que no estaban tratados con insecticidas tópicos y/o dormían al aire libre (Grupo 2). Estos resultados coinciden con observaciones previas de otros autores en experimentos con perros expuestos naturalmente a la picadura de *P. perniciosus*, en los que los animales tratados con insecticida recibieron un menor número de picaduras que los no tratados, y desarrollaron una leve respuesta de anticuerpos IgG antisaliva (18,20). El tratamiento con insecticidas es considerado como una de las principales estrategias en el control de la leishmaniosis canina para reducir el riesgo de la infección humana (107). En consecuencia, el seguimiento de los anticuerpos antisaliva en perros proporcionaría una información muy valiosa sobre la eficacia de los programas de control.

En el estudio de la exposición de reservorios a las picaduras de *P. perniciosus*, en el contexto del brote de leishmaniosis del suroeste de la Comunidad de Madrid, no se incluyeron los datos de infección de los animales por *L. infantum*. La preva-

lencia de la leishmaniosis canina en esta zona era demasiado baja, probablemente debido a la eficacia de las medidas adoptadas por los propietarios para proteger a sus perros frente a la picadura, y por tanto no se dispuso de suficientes sueros de perros positivos para *L. infantum* procedentes del brote. Serán necesarios estudios más pormenorizados para establecer una relación clara entre la respuesta antisaliva y la leishmaniosis.

Por otro lado, también se utilizó la proteína amarilla rSP03B para evaluar la exposición de liebres, conejos y perros a las picaduras de *P. perniciosus* ya que, en experimentos previos, había sido reconocida por los sueros de perros expuestos experimentalmente (106). Se trata de una proteína prometedora a utilizar como marcador de exposición ya que muestra buenos resultados con los sueros de liebres, conejos y perros expuestos de forma natural y con los sueros de ratones y perros expuestos de forma experimental (106).

## REFERENCIAS

1. Volf P, Tesarova P, & Nohynkova EN (2000) Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age *Med Vet Entomol* 14(3):251-256.
2. Ribeiro JM, Mans BJ, & Arcà B (2010) An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochem Mol Biol* 40(11):767-784.
3. Krenn HW & Aspöck H (2012) Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Struct Dev* 41(2):101-118.
4. Fontaine A, *et al.* (2011) Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit Vectors* 4:187.
5. Rochael NC, *et al.* (2013) *Leishmania amazonensis* exhibits phosphatidylserine-dependent procoagulant activity, a process that is counteracted by sandfly saliva. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(6):679-685.
6. Andersen JF, *et al.* (2023) A bispecific inhibitor of complement and coagulation blocks activation in complementopathy models via a novel mechanism. *Blood* 141(25):3109-3121.
7. Valenzuela JG (2002) High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochem Mol Biol* 32(10):1199-1209.
8. Sumova P, *et al.* (2019) Amine-binding properties of salivary yellow-related proteins in phlebotomine sand flies. *Insect Biochem Mol Biol* 115:103245.

9. Collin N, *et al.* (2012) Lufaxin, a novel factor Xa inhibitor from the salivary gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* blocks protease-activated receptor 2 activation and inhibits inflammation and thrombosis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(9):2185-2198.
10. Ribeiro JM (1987) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Rev Entomol* 32:463-478.
11. Belkaid Y, *et al.* (2000) Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6704-6709.
12. Belkaid Y, *et al.* (1998) Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188(10):1941-1953.
13. Ghosh KN & Mukhopadhyay J (1998) The effect of anti-sandfly saliva antibodies on *Phlebotomus argentipes* and *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol* 28(2):275-281.
14. Valenzuela JG, *et al.* (2001) Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194(3):331-342.
15. Volf P & Rohoušová I (2001) Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122 Pt 1:37-41.
16. Rohoušová I, Ozensoy S, Ozbek Y, & Volf P (2005) Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130(Pt 5):493-499.
17. Silva F, *et al.* (2005) Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72(1):94-98.
18. Vlková M, *et al.* (2011) Canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* bites negatively correlates with the risk of *Leishmania infantum* transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 5(10):e1344.
19. Vlková M, *et al.* (2012) Kinetics of antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Negl Trop Dis* 6(7):e1719.
20. Hostomská J, *et al.* (2008) Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis (Larchmont, N.Y)* 8(4):443-450.

21. Vinhas V, *et al.* (2007) Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *Eu J Immunol* 37(11):3111-3121.
22. Vlková M, *et al.* (2014) Comparative Analysis of Salivary Gland Transcriptomes of *Phlebotomus orientalis* Sand Flies from Endemic and Non-endemic Foci of Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8(2):e2709.
23. Paranhos-Silva M, *et al.* (2003) A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet Parasitol* 114(2):97-111.
24. Barral A, *et al.* (2000) Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62(6):740-745.
25. Gomes RB, *et al.* (2007) Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101(2):127-133.
26. Souza AP, *et al.* (2010) Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis* 4(3):e649.
27. Teixeira C, *et al.* (2010) Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4(3):e638.
28. Bahia D, *et al.* (2007) Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Res* 100(3):449-454.
29. Geraci NS, *et al.* (2014) Profiling of Human Acquired Immunity Against the Salivary Proteins of *Phlebotomus papatasi* Reveals Clusters of Differential Immunoreactivity. *Am J Trop Med Hyg* 90(5): 923-938.
30. Maia C, *et al.* (2020) Monitoring *Leishmania* infection and exposure to *Phlebotomus perniciosus* using minimal and non-invasive canine samples. *Parasit Vectors* 13(1):119.
31. Vasconcelos CO, *et al.* (2014) Distinct cellular migration induced by *Leishmania infantum chagasi* and saliva from *Lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56(1):21-27.
32. Peters NC, *et al.* (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321(5891):970-974.
33. Oliveira F, *et al.* (2006) From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24(3):374-390.

34. Ribeiro JM (1995) Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4(3):143-152.
35. Titus RG & Ribeiro JM (1988) Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239(4845):1306-1308.
36. Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, & Titus RG (2001) Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 167(9):5226-5230.
37. Prates DB, *et al.* (2011) *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J Leukoc Biol* 90(3):575-582.
38. Ribeiro JM, Katz O, Pannell LK, Waitumbi J, & Warburg A (1999) Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol* 202(Pt 11):1551-1559.
39. Katz O, Waitumbi JN, Zer R, & Warburg A (2000) Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 62(1):145-150.
40. Volfova V, Hostomska J, Cerny M, Votypka J, & Volf P (2008) Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on leishmania infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2(9):e294.
41. Chagas AC, *et al.* (2014) Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases *Leishmania* Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits XIIa Contact Activation in Human Plasma. *PLoS Pathogens* 10(2):e1003923.
42. Martin-Martin I, *et al.* (2018) Immunity to LuloHya and Lundep, the salivary spreading factors from *Lutzomyia longipalpis*, protects against *Leishmania major* infection. *PLoS Pathogens* 14(5):e1007006.
43. Bell JF, Stewart SJ, & Wikel SK (1979) Resistance to tick-borne *Francisella tularensis* by tick-sensitized rabbits: allergic klendusity. *Am J Trop Med Hyg* 28(5):876-880.
44. Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK, Burkot TR, & Piesman J (1997) Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect Immun* 65(1):335-338.
45. Nazario S, *et al.* (1998) Prevention of *Borrelia burgdorferi* transmission in guinea pigs by tick immunity. *Am J Trop Med Hyg* 58(6):780-785.

46. Jones LD & Nuttall PA (1990) The effect of host resistance to tick infestation on the transmission of *Thogoto* virus by ticks. *J Gen Virol* 71 (Pt 5):1039-1043.
47. Costa DJ, *et al.* (2004) *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun* 72(3):1298-1305.
48. Gomes RB, *et al.* (2002) Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *The J Inf Dis* 186(10):1530-1534.
49. Rohoušová I & Volf P (2006) Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitol* 53(3):161-171.
50. Oliveira F, Lawyer PG, Kamhawi S, & Valenzuela JG (2008) Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2(4):e226.
51. Gomes R, *et al.* (2012) Immunity to Sand Fly Salivary Protein LJM11 Modulates Host Response to Vector-Transmitted *Leishmania* Conferring Ulcer-Free Protection. *J Invest Dermatol* 132(12):2735-2743.
52. Gomes R, *et al.* (2008) Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7845-7850.
53. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, & Sacks D (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290(5495):1351-1354.
54. Collin N, *et al.* (2009) Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathogens* 5(5):e1000441.
55. Aguiar-Soares RD, *et al.* (2014) LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4+ and CD8+) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasit Vectors* 7(1):61.
56. Oliveira F, *et al.* (2015) A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. *Sci Transl Med* 7(290):290ra290.
57. Abi Abdallah DS, *et al.* (2014). A *Listeria monocytogenes*-based vaccine that secretes sand fly salivary protein LJM11 confers long-term protection against vector-transmitted *Leishmania major*. *Infect Immun*. 2014 Jul;82(7):2736-45.

58. da Silva RA, *et al.* (2011) DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 120(3):185-190.
59. Giunchetti RC, *et al.* (2008) A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine* 26(5):623-638.
60. Zahedifard F, *et al.* (2014) Enhanced protective efficacy of nonpathogenic recombinant *Leishmania tarentolae* expressing cysteine proteinases combined with a sand fly salivary antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 8(3):e2751.
61. Manning JE, *et al.* (2020) Safety and immunogenicity of a mosquito saliva peptide-based vaccine: a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 1 trial. *Lancet* 395(10242):1998-2007.
62. Manning JE, Morens DM, Kamhawi S, Valenzuela JG, & Memoli M (2018) Mosquito Saliva: The Hope for a Universal Arbovirus Vaccine? *J Inf Dis* 218(1):7-15.
63. Schwartz BS, Ribeiro JM, & Goldstein MD (1990) Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132(1):58-66.
64. Palosuo K, Brummer-Korvenkontio H, Mikkola J, Sahi T, & Reunala T (1997) Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquito bites. *Int Arch Allergy Immunol* 114(4):367-372.
65. Peng Z, Rasic N, Liu Y, & Simons FE (2002) Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors. *J Allergy Clin Immunol* 110(5):816-817.
66. Drame PM, *et al.* (2010) Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. *Am J Trop Med Hyg* 83(1):115-121.
67. Gidwani K, *et al.* (2011) Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis* 5(9):e1296.
68. Soares BR, *et al.* (2013) Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral Leishmaniasis. *Sci Rep* 3:2352.
69. Trevejo RT, Reisen WK, Yoshimura G, & Reeves WC (2005) Detection of chicken antibodies to mosquito salivary gland antigens by enzyme immunoassay. *J Am Mosq Control Assoc* 21(1):39-48.

70. Clements MF, *et al.* (2010) Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of indian visceral leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 82(5):801-807.
71. Iniguez E, *et al.* (2022) A Composite Recombinant Salivary Proteins Biomarker for *Phlebotomus argentipes* Provides a Surveillance Tool Postelimination of Visceral Leishmaniasis in India. *J Inf Dis* 226(10):1842-1851.
72. Sumova P, *et al.* (2021) PpSP32-like protein as a marker of human exposure to *Phlebotomus argentipes* in *Leishmania donovani* foci in Bangladesh. *Int j Parasitol* 51(12):1059-1068.
73. Poinsignon A, *et al.* (2008) Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* 78(5):750-753.
74. Drame PM, *et al.* (2011) Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. *PLoS One* 5(12):e15596.
75. Schwarz A, *et al.* (2009) Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol* 39(9):1021-1029.
76. Londono-Renteria BL, *et al.* (2018) Serosurvey of Human Antibodies Recognizing *Aedes aegypti* D7 Salivary Proteins in Colombia. *Front Public Health* 6(111).
77. Willen L, *et al.* (2021) Human immune response against salivary antigens of *Simulium damnosum* s.l.: A new epidemiological marker for exposure to blackfly bites in onchocerciasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis* 15(6):e0009512.
78. Arce A, *et al.* (2013) Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro surveillance* 18(30):20546.
79. Gálvez R, *et al.* (2010) Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 169(3-4):327-334.
80. Gálvez R, *et al.* (2020) Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions. *Parasit Vectors* 13(1):204.
81. Moreno I, *et al.* (2014) Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet Parasitol* 199:264-267.

82. Molina R, *et al.* (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* 190(1-2):268-271.
83. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, & Molina R (2014) Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol* 202(3-4):296-300.
84. Aguado M, *et al.* (2013) Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Fuenlabrada, Madrid. *Actas dermo-sifiliograficas* 104(4):334-342.
85. González E, *et al.* (2021) Opportunistic feeding behaviour and *Leishmania infantum* detection in *Phlebotomus perniciosus* females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012-2018). *PLoS Negl Trop Dis* 15(3):e0009240.
86. Jiménez M, *et al.* (2013) Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res* 112(7):2453-2459.
87. Martín-Martín I, Molina R, & Jiménez M (2012) An insight into the *Phlebotomus perniciosus* saliva by a proteomic approach. *Acta Trop* 123(1):22-30.
88. 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. *Biomed Res Int* 2013:526069.
89. Martín-Martín I, *et al.* (2014) High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniasis focus in Madrid, Spain. *Vet Parasitol* 202(3-4):207-216.
90. Gonzalez E, Jimenez M, Hernandez S, Martin-Martin I, & Molina R (2017) Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasit Vectors* 10(1):368.
91. Martín-Martín I, *et al.* (2014) High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in hares and other animals in the emerging leishmaniasis focus in Madrid, Spain. *Vet Parasitol.* 202(3-4):207-16.
92. Burnham AC, *et al.* (2020) Exploring the relationship between susceptibility to canine leishmaniasis and anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in Ibizan hounds and dogs of other breeds in Mallorca, Spain. *Parasit Vectors* 13(1):129.

93. Velez R, *et al.* (2018) Seasonal dynamics of canine antibody response to *Phlebotomus perniciosus* saliva in an endemic area of *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors* 11(1):545.
94. Risueño J, *et al.* (2019) Longitudinal monitoring of anti-saliva antibodies as markers of repellent efficacy against *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus papatasi* in dogs. *Med Vet Entomol* 33(1):99-109.
95. Carmo CR, Esteves PJ, Ferrand N, & van der Loo W (2006) Genetic variation at chemokine receptor CCR5 in leporids: alteration at the 2nd extracellular domain by gene conversion with CCR2 in *Oryctolagus*, but not in *Sylvilagus* and *Lepus* species. *Immunogenetics* 58(5-6):494-501.
96. Benito-De Martín MI, Gracia-Salinas MJ, Molina-Moreno R, Ferrer-Dufol M, & Lucientes-Curdi J (1994) Influence de la nature du sang ingere sur les parametres gonotrophiques de *Phlebotomus perniciosus* sous conditions de laboratoire. *Parasite (Paris, France)* 1(4):409-411.
97. Killick-Kendrick M & Killick-Kendrick R (1991) The initial establishment of sandfly colonies. *Parassitologia* 33 (Suppl):315-320.
98. Volf P & Volfova V (2011) Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol* 36 Suppl 1:S1-9.
99. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, & Molina R (2014) Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol.* 202(3-4):296-300.
100. Gálvez R, *et al.* (2010) Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop* 115(1-2):95-102.
101. Martín-Martín I, Molina R, & Jiménez M (2015) Kinetics of Anti-*Phlebotomus perniciosus* Saliva Antibodies in Experimentally Bitten Mice and Rabbits. *PLoS ONE* 10(11):e0140722.
102. Rohoušová I, *et al.* (2011) The protective effect against *Leishmania infection* conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. *International journal for parasitology* 41(5):481-485.
103. Suárez-Rodríguez B, *et al.* (2012) Situacion epidemiologica y de los factores de riesgo de transmision de *Leishmania infantum* en España. *Rev Española Salud Publica* 86(6):555-564.
104. Brosseau L, *et al.* (2012) Human antibody response to *Anopheles* saliva for comparing the efficacy of three malaria vector control methods in Balombo, Angola. *PLoS One* 7(9):e44189.

105. Schwarz A, *et al.* (2011) Anti-triatomine saliva immunoassays for the evaluation of impregnated netting trials against Chagas disease transmission. *Int J Parasitol* 41(6):591-594.
106. Drahota J, *et al.* (2014) Recombinant antigens from *Phlebotomus perniciosus* saliva as markers of canine exposure to visceral leishmaniases vector. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1):e2597.
107. Alexander B & Maroli M (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 17(1):1-18.

## CAPÍTULO 12

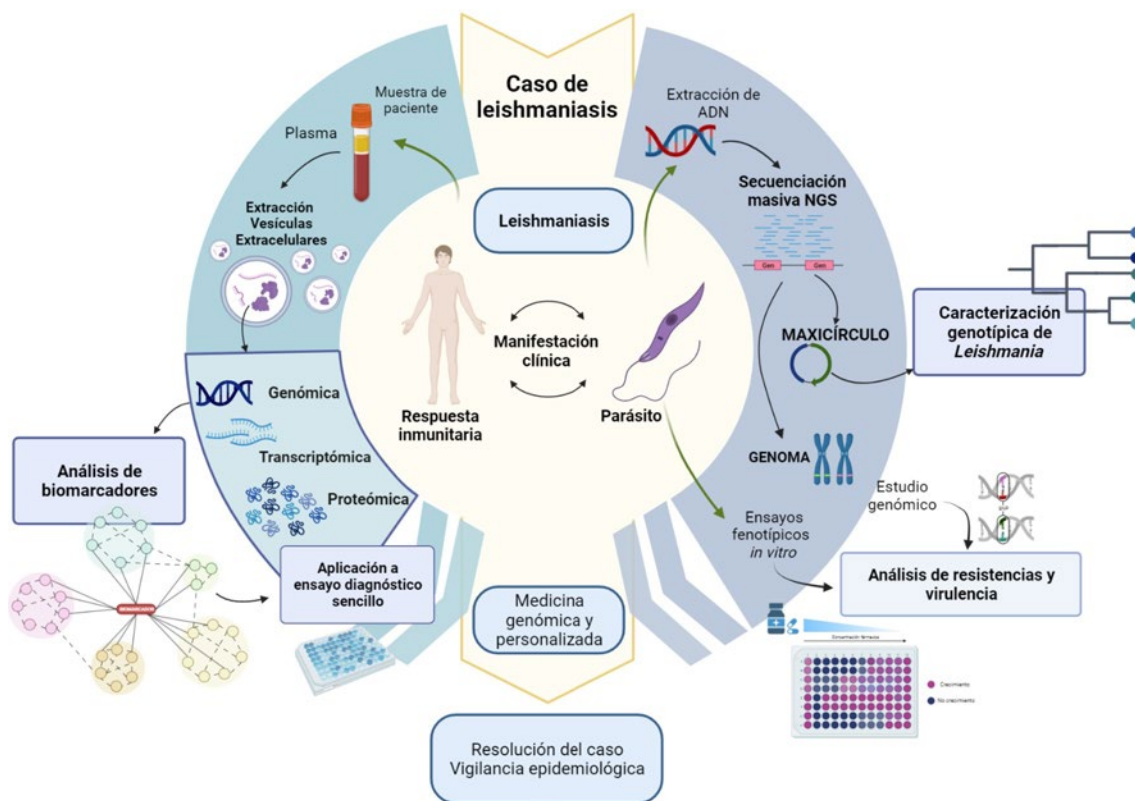
# Nuevas aproximaciones y aplicaciones en el estudio de brotes de leishmaniasis

**Lorena Bernardo, Bárbara Domínguez, Ana María Torres, José Carlos Solana**

Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. Centro Nacional de Microbiología (ISCIII). Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis. CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III.

Uno de los retos más importantes en el control de un brote de leishmaniasis tiene que ver con la obtención de información suficiente como para encontrar su origen y detener su expansión, así como prever e impedir la aparición de nuevos focos de la enfermedad. Dado que el desarrollo de la leishmaniasis tras la infección depende tanto de la susceptibilidad de la población afectada, como de las características de los parásitos responsables, es necesario analizar ambos aspectos y establecer su papel en el aumento de los casos. Actualmente es posible abordar esta tarea con gran grado de detalle gracias a la implementación cada vez mayor de técnicas y herramientas con las que estudiar el total del ADN de una muestra biológica (genómica), su ARN (transcriptómica) o el conjunto de sus proteínas (proteómica). El empleo de estas aproximaciones forma parte de los objetivos de la Acción Estratégica en Salud relacionados con la medicina personalizada, de precisión o medicina genómica, y su aplicación en muestras biológicas procedentes del brote de leishmaniasis ha permitido obtener nueva información ([Figura 1](#)). Por un lado, se han realizado análisis proteómicos en vesículas extracelulares obtenidas del plasma en búsqueda de biomarcadores que definan distintos grados de evolución de la enfermedad. Por otro lado, se han realizado estudios genómicos y fenotípicos sobre las cepas de *Leishmania* causantes de los casos clínicos en el pasado brote de leishmaniasis del suroeste de la Comunidad de Madrid.

**Figura 1. Estrategia para el desarrollo de la medicina de precisión en leishmaniasis.**



## BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE LEISHMANIASIS EN VESÍCULAS EXTRACELULARES

Los biomarcadores proporcionan información útil asociada con el diagnóstico, pronóstico, evolución o respuesta al tratamiento de una enfermedad. No obstante, en el contexto de la leishmaniasis visceral, aún persiste la necesidad de hallar biomarcadores que permitan desarrollar herramientas para evaluar la efectividad de los tratamientos, certificar la cura e identificar a individuos asintomáticos (1).

En esta última década, la investigación en vesículas extracelulares (VEs) como una fuente de biomarcadores para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico ha experimentado un crecimiento significativo. Las VEs son partículas lipídicas producidas y secretadas por una amplia variedad de células que se encuentran distribuidas por diferentes fluidos corporales como el plasma, suero, orina, semen, saliva o leche materna, entre otros (2). Su contenido está principalmente compuesto por proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y diversos metabolitos, y manifiesta un patrón característico e influenciado por el linaje celular del que provienen. Este perfil se relaciona

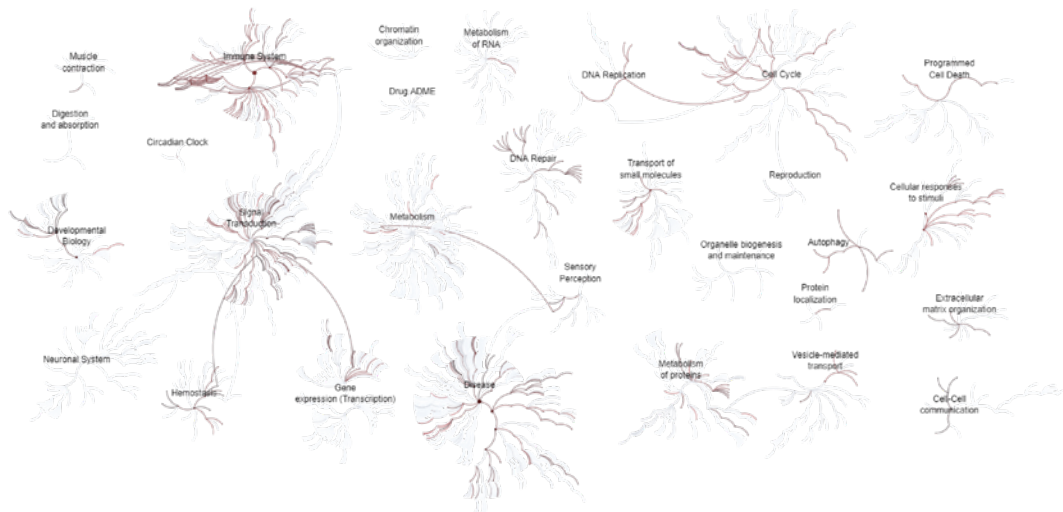
con los múltiples procesos biológicos en los que estas vesículas participan, siendo la comunicación intercelular la más destacada (3). Así, su capacidad para transferir información entre células ejerce un notable efecto en otras funciones biológicas tales como la proliferación celular, el metabolismo o la respuesta inmunológica (4).

Es debido a la influencia que estas vesículas ejercen sobre la respuesta inmunitaria que la investigación en enfermedades infecciosas, como la leishmaniasis, ha ido centrado gradualmente su atención en entender su papel en las relaciones patógeno-hospedador y las funciones específicas que ejerce el parásito durante la infección (5,6). Sin embargo, todavía no se han caracterizado en estas vesículas biomarcadores inmunológicos para la leishmaniasis humana. Esto supondría un gran avance en el diagnóstico y manejo clínico de la leishmaniasis visceral, ya que un biomarcador que indique que se ha logrado la cura podría usarse para reducir los tiempos y ajustar las dosis de tratamiento, prevenir el riesgo de recaídas y apoyar la investigación de nuevos tratamientos de la enfermedad (1).

Por esa razón, el laboratorio de leishmaniasis del Centro Nacional de Microbiología (CNM) ha realizado un estudio para identificar biomarcadores de cura en vesículas extracelulares aisladas de plasma de pacientes del brote de leishmaniasis del suroeste del área metropolitana de Madrid. Este estudio compara los perfiles proteicos de VEs aisladas de plasma de pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral activa con aquellas obtenidas de pacientes a 1, 3 y 6 meses después de comenzar el tratamiento antiparasitario. La selección de estos intervalos de seguimiento se fundamentó en las directrices de la OMS, que aconsejan un seguimiento mínimo de 6 meses después del tratamiento para evaluar la curación completa de la leishmaniasis visceral.

En primer lugar, se estableció una metodología para el aislamiento de las VEs en plasma que combina una cromatografía de exclusión molecular, que separa las VEs por tamaño en distintas fracciones (7), con una posterior ultracentrifugación diferencial para concentrar y aislar las vesículas extracelulares de otros componentes del fluido. Para caracterizar estas vesículas aisladas, se evaluaron diversos parámetros, como la concentración de partículas y el tamaño promedio de las mismas mediante la tecnología de seguimiento de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés), la morfología de las partículas a través de microscopía electrónica de transmisión, el contenido total de proteínas mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA) y la detección marcadores característicos de VEs mediante Western blot. Finalmente, se identificaron y cuantificaron las proteínas presentes en las vesículas mediante espectrometría de masas.

**Figura 2. Diagrama de las rutas de las 153 proteínas identificadas en la base de datos Reactome. En color rojo se resaltan las rutas afectadas por el cambio en los niveles de expresión y en gris aquellas rutas que no se encuentran alteradas. Esta representación sencilla proporciona una visión general de las vías alteradas, lo que facilita la investigación de posibles biomarcadores que están involucrados en las rutas específicas relacionadas con la leishmaniasis visceral.**

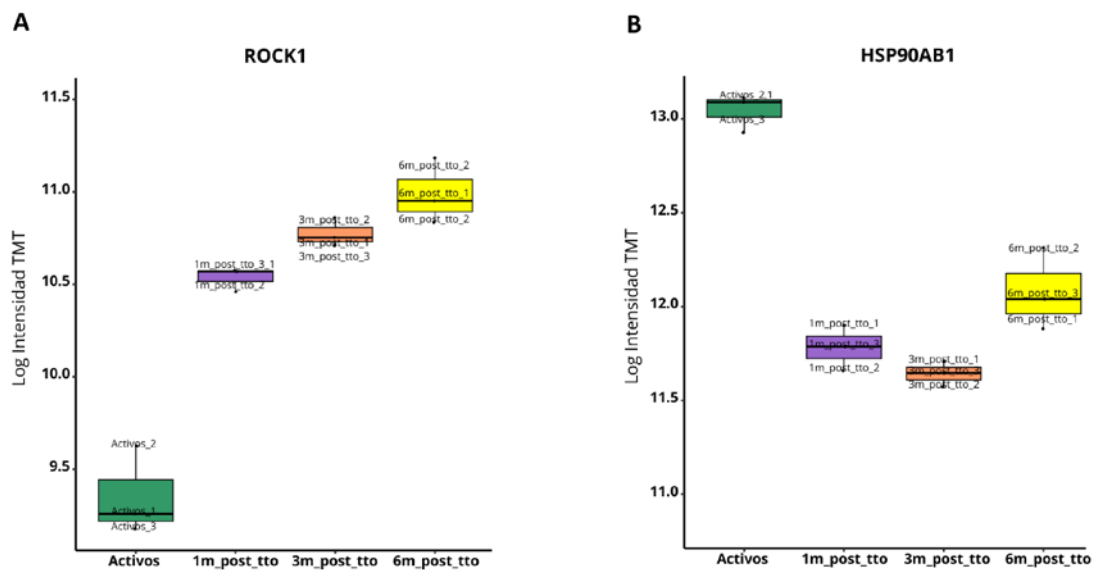


Los resultados de la caracterización proteómica y el análisis comparativo revelaron una marcada distinción de los perfiles proteicos entre los diversos grupos de pacientes, sugiriendo un perfil característico y distinguible entre ellos. En concreto, se identificaron un total de 153 proteínas que eran comunes para todos los grupos de pacientes, pero cuyos niveles de expresión difieren significativamente entre ellos. También se determinó su función en la base de datos *Reactome* (<https://reactome.org/>), y se encontró que participan en un total de 860 rutas, agrupadas principalmente en las categorías de transducción de señales, respuesta inmunológica y enfermedad (Figura 2). Además, dentro de la categoría de enfermedad se identificaron 51 proteínas, de las cuales 12 de ellas participan en diversas vías relacionadas con el proceso de infección por *Leishmania*.

Algunas de estas proteínas son potenciales biomarcadores capaces de discriminar entre individuos enfermos y curados. Por ejemplo, la proteína ROCK1, que está vinculada a la respuesta inmunitaria, se encuentra en mayor cantidad en pacientes curados debido a la recuperación de la respuesta inmunitaria tras el tratamiento (Figura 3A). Mientras que HSP90AB1 está asociada con la ruta de infección por *Leishmania* y es más abundante en los enfermos (Figura 3B). Las diferencias entre la abundancia de ambas proteínas en los pacientes curados durante el seguimiento a 1, 3 y 6 meses abre la posibilidad que sean útiles también como biomarcadores tempranos de cura (entre 1 y 3 meses tras el tratamiento). La validación de estos

posibles biomarcadores, junto con otros candidatos, a través de técnicas complementarias como ELISA o Western Blot, es esencial para garantizar su utilidad diagnóstica antes de su aplicación en el ámbito clínico.

**Figura 3. Análisis comparativo de la expresión diferencial de dos potenciales biomarcadores de cura entre los distintos grupos de pacientes. Se presenta el logaritmo de la intensidad de señal de TMT en relación a los grupos de pacientes. TMT (Tandem Mass Tags) es una «etiqueta» que se une a los péptidos que conforman las proteínas para permitir su cuantificación por el espectrómetro de masas. Los grupos analizados incluyen pacientes activos con leishmaniasis visceral (LV) y pacientes en seguimiento a 1, 3 y 6 meses después del tratamiento.**



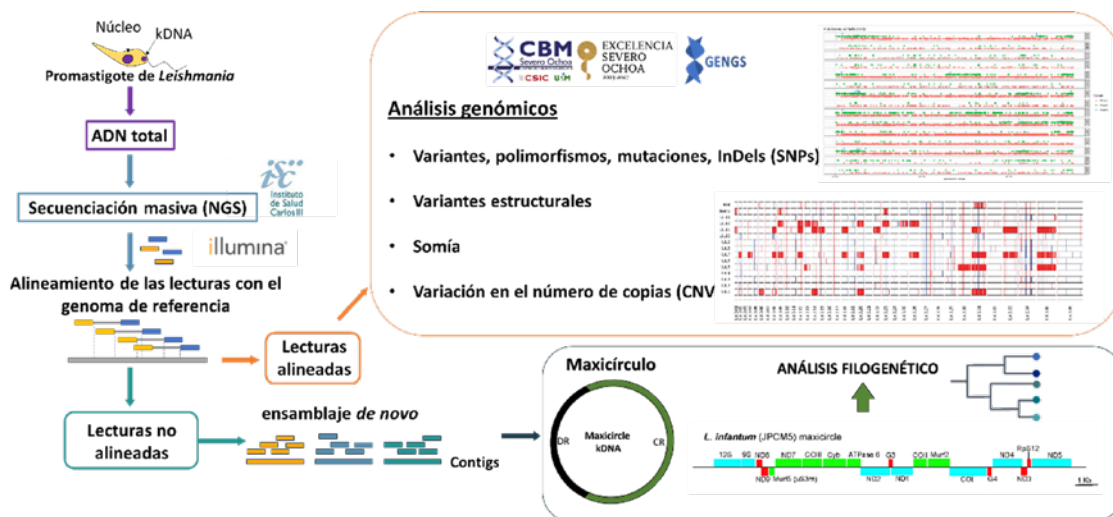
Estos resultados confirman que la investigación en la identificación de biomarcadores en vesículas extracelulares de plasma sanguíneo es una vía muy prometedora en el campo de las enfermedades infecciosas como la leishmaniasis, y ofrecen la posibilidad de identificar biomarcadores tempranos de curación, lo que mejoraría la evaluación de la respuesta al tratamiento, y beneficiaría el diagnóstico y tratamiento de casos en brotes epidémicos, como el ocurrido en la Comunidad de Madrid.

## ESTUDIOS GENÓMICOS EN CEPAS DE LEISHMANIA PRESENTES EN EL BROTE

Como ya se ha mencionado, el análisis de las características moleculares de los parásitos aislados durante el brote es fundamental para entender su origen y las causas de su aparición, así como obtener información útil para su control (distribución, hospedadores, resistencias al tratamiento, etc.). Aunque las nuevas herramientas de

secuenciación masiva (NGS) permiten realizar un análisis molecular minucioso, es necesario disponer de una secuencia de referencia del genoma de *L. infantum* con el que alinear las lecturas (secuencias) obtenidas. En 2018 el grupo de investigación del profesor Jose María Requena de la Universidad Autónoma de Madrid y el Servicio de Genómica y Secuenciación Masiva del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, publicaron un ensamblaje completo del genoma de la cepa JPCM5 de *L. infantum* (8) y una secuencia de referencia para esta especie, cuya anotación (identificación en la secuencia de cada uno de los genes) se mejora de forma constante (9). Gracias a ello, ha sido posible realizar la secuenciación masiva del ADN de un conjunto de 47 cepas de *L. infantum* causantes de casos de leishmaniasis durante el pasado brote. El resultado es una caracterización molecular con un grado de detalle y una profundidad sin precedentes (Figura 4).

**Figura 4. Flujo de trabajo NGS en cepas de *Leishmania*. El ADN nuclear y del kinetoplasto (kDNA) extraído de *Leishmania* es secuenciado mediante la tecnología de Illumina. Las secuencias obtenidas de pequeño tamaño son alineadas con el genoma de referencia de *L. infantum* JPCM5. Con aquellas que alinean se realizan análisis genómicos para determinar la presencia de polimorfismos, variaciones en el número de copias génicas o el número de cromosomas (somía), entre otros. Las lecturas que no alinean con la secuencia de los cromosomas son empleadas para ensamblar el contig correspondiente con el maxicirculo de *Leishmania* y realizar el análisis filogenético.**



### NGS para la tipificación de cepas clínicas de *L. infantum*

La obtención de datos de secuenciación masiva supone disponer del total de marcadores filogenéticos presentes en el genoma de *Leishmania*. No obstante, la aproximación elegida para su análisis determina la rapidez, precisión, profundidad

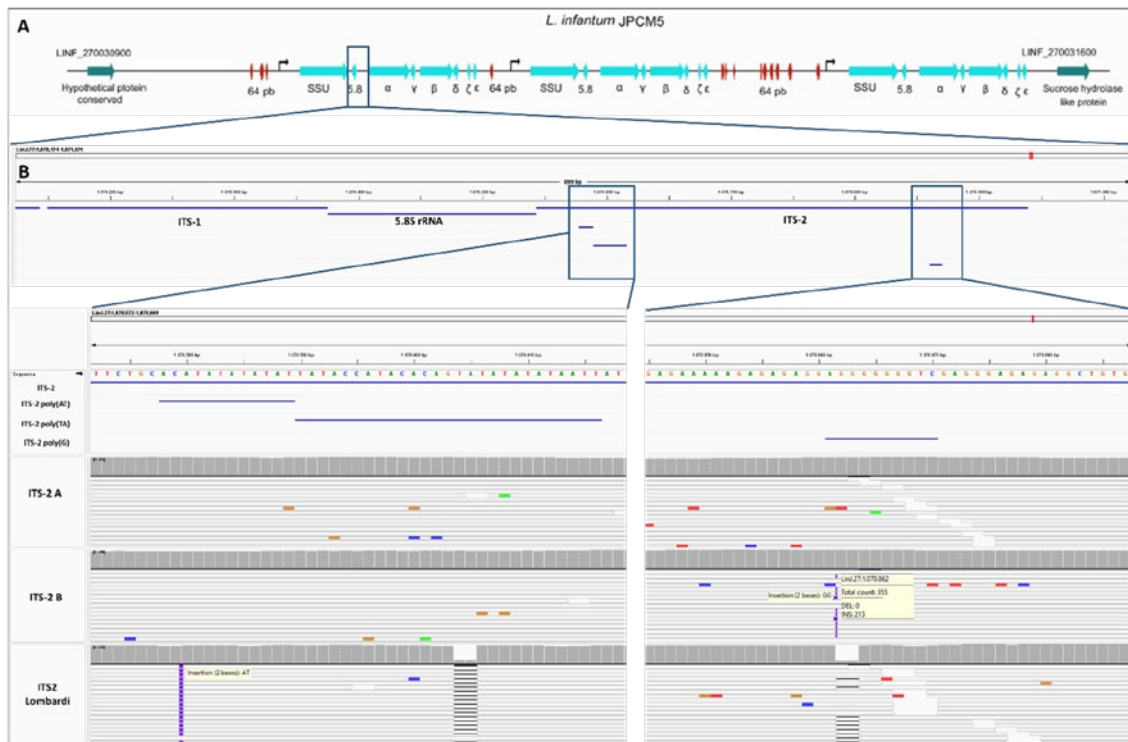
y fiabilidad de los resultados. A continuación, se expone un ejemplo representativo de tres aproximaciones que emplean distinta cantidad de información y necesitan de más o menos requerimientos computacionales o complejidad en el análisis.

### Tipificación basada en el locus ribosomal

La aproximación más sencilla es el análisis comparativo de la secuencia de una región del genoma con suficiente información filogenética como, por ejemplo, la de las regiones espaciadoras internas (ITS) del locus ribosomal ([Figura 5](#)). Debido a su variabilidad en la secuencia, las regiones ITS-1 e ITS-2 se utilizan habitualmente para la tipificación de especies de *Leishmania* y la identificación de genotipos en el complejo *L. donovani* mediante secuenciación Sanger ([10](#)). Como ya fue reportado previamente durante el estudio pormenorizado de los casos del brote de leishmaniasis ([11](#)), la mayoría de las cepas analizadas presentan, de acuerdo a la secuencia de la región ITS-2, un genotipo «Lombardi» (33; 70,21%), seguido del genotipo A (12; 25,33%), y también se detectó la presencia del genotipo B (1; 2,13%). Los genotipos A (el de la cepa de referencia JPCM5) y B se han descrito habitualmente en cepas de *L. infantum* aisladas en la Cuenca Mediterránea y están relacionados con el zimodema MON-1. La clasificación por zimodemas es un anterior método de referencia para la tipificación basado en el examen electroforético de isoenzimas (MLEE). Por otro lado, el genotipo Lombardi (denominado así por la cepa MHOM/ES/1987/Lombardi) se relaciona con el zimodema MON-24 y parece ser el principal responsable de este brote de leishmaniasis, pues se ha encontrado en la mayoría de casos clínicos y en las liebres infectadas que sirvieron de reservorio ([11,12](#)).

La secuenciación del locus ribosomal continúa siendo un método de referencia para realizar análisis filogenéticos, aunque no está exento de limitaciones. El análisis de millones de lecturas de secuenciación masiva ha puesto de manifiesto que esta región conservada tiene un polimorfismo genético mayor del esperado y que puede pasar desapercibido durante la secuenciación Sanger. Por ejemplo, existen variaciones en la secuencia entre las distintas unidades ribosomales dispuestas en tándem que forman el locus ribosomal de una misma cepa ([Figura 5](#)), lo que impide en algunos casos obtener un resultado claro o significativo desde el punto de vista evolutivo. Este hecho puede explicar por qué este marcador no es capaz de discriminar adecuadamente entre algunas cepas o especies (especialmente en el subgénero *Viannia*).

**Figura 5. El locus ribosomal en *Leishmania infantum*. A) Esquema de la organización de la región ribosomal con los elementos anotados en *L. infantum*. B) Alineamiento de las lecturas NGS y detalle de las regiones ITS-2 utilizadas para la identificación de los genotipos A, B y Lombardi. En el genotipo Lombardi se observa una inserción en la región ITS-2 poly(AT), una delección en la región poly(TA) y otra en el poly(G). El genotipo B tiene una inserción de 2 bases en la región poly(G), aunque solo en el 60% de las lecturas.**

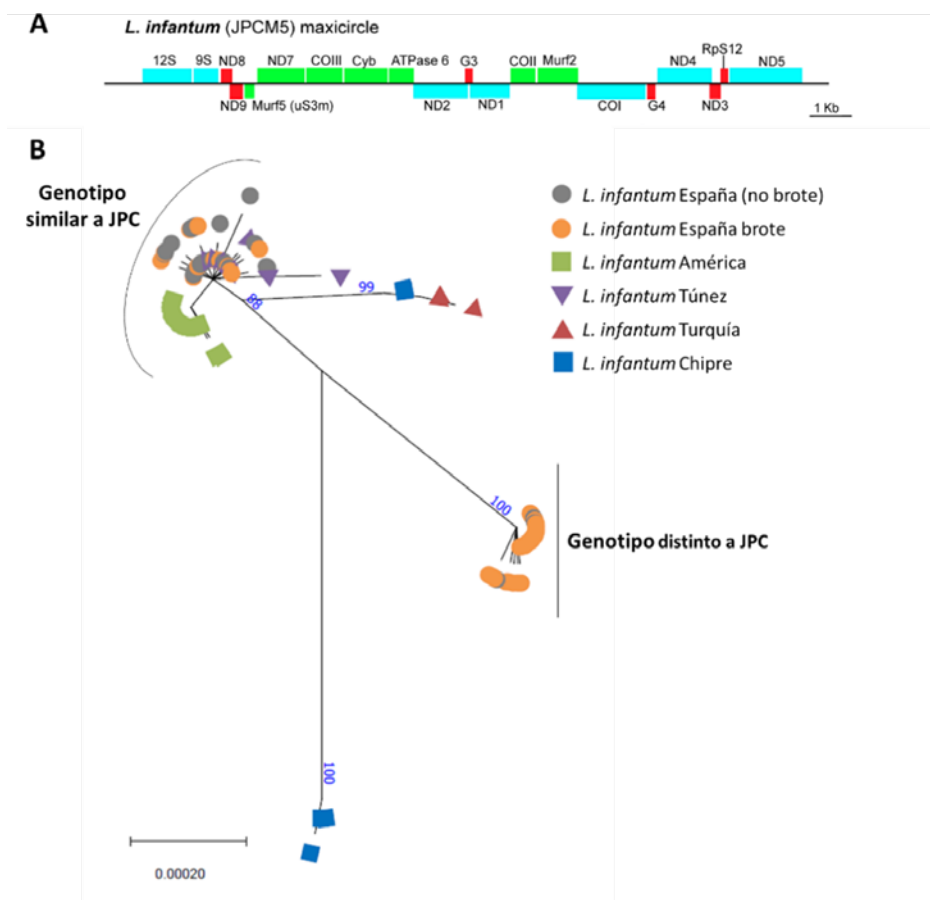


### El maxicírculo de *Leishmania* como marcador filogenético

Una estrategia alternativa es la elección de un marcador genético cuya variabilidad dependa exclusivamente de la evolución filogenética de los parásitos y no se vea sometido a otras variaciones que puedan añadir ruido o desinformación. En ese sentido, resulta muy interesante las características que definen al ADN mitocondrial, que en *Leishmania* se encuentra en una estructura denominada kinetoplasto (*kDNA*). El kinetoplasto está formado por una red de decenas de maxicírculos, que son el equivalente al genoma mitocondrial en la mayoría de eucariotas, y miles de pequeños minicírculos importantes en el procesamiento postranscripcional de los genes del maxicírculo. La secuencia del maxicírculo que codifica los genes del genoma mitocondrial está muy conservada entre la familia de los tripanosomátidos y constituye un marcador fiable para determinar las relaciones evolutivas entre estos organismos. Además, esta región codificante constituye una concatenación natural de genes con alto valor filogenético ([Figura 6](#)), con una estructura similar a las

construcciones artificiales con las secuencias de varios genes cromosómicos que se emplean en algunas técnicas de genotipado como el *MulltiLocus Sequence Typing* (*MLST*). Sin embargo, y a diferencia del ADN cromosómico, el ADN del kinetoplasto se hereda de forma monoparental y no se ve afectado por polimorfismos y eventos de recombinación e hibridación entre especies o cepas. A pesar de todas estas ventajas, el empleo de la región codificante del maxicírculo como marcador filogenético no se ha podido desarrollar hasta hace poco. Debido a su tamaño (17 kb, aproximadamente) ha sido necesario el uso de técnicas de secuenciación masiva o el diseño de *long-range PCR* para su ensamblaje.

**Figura 6. Estudio filogenético mediante el *kDNA* del maxicírculo. A) Diagrama esquemático de la región codificante del maxicírculo de *L. infantum* (Obtenido de Solana JC et al 2022 JCS: o, también, Solana y col., 2022 (13)). B) Relación filogenética entre 124 cepas de *L. infantum* procedentes de la Cuenca Mediterránea y América. Tras el alineamiento de las secuencias con MUSCLE su historia evolutiva fue inferida de mediante el método de máxima similitud de Tamura-Nei. Se construyó un árbol filogenético de acuerdo la distancia evolutiva calculada por los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ. En el árbol con la mayor similitud (log -20421,15) se indica el porcentaje de los 1000 árboles construidos en los que los taxones asociados se agrupan conjuntamente.**

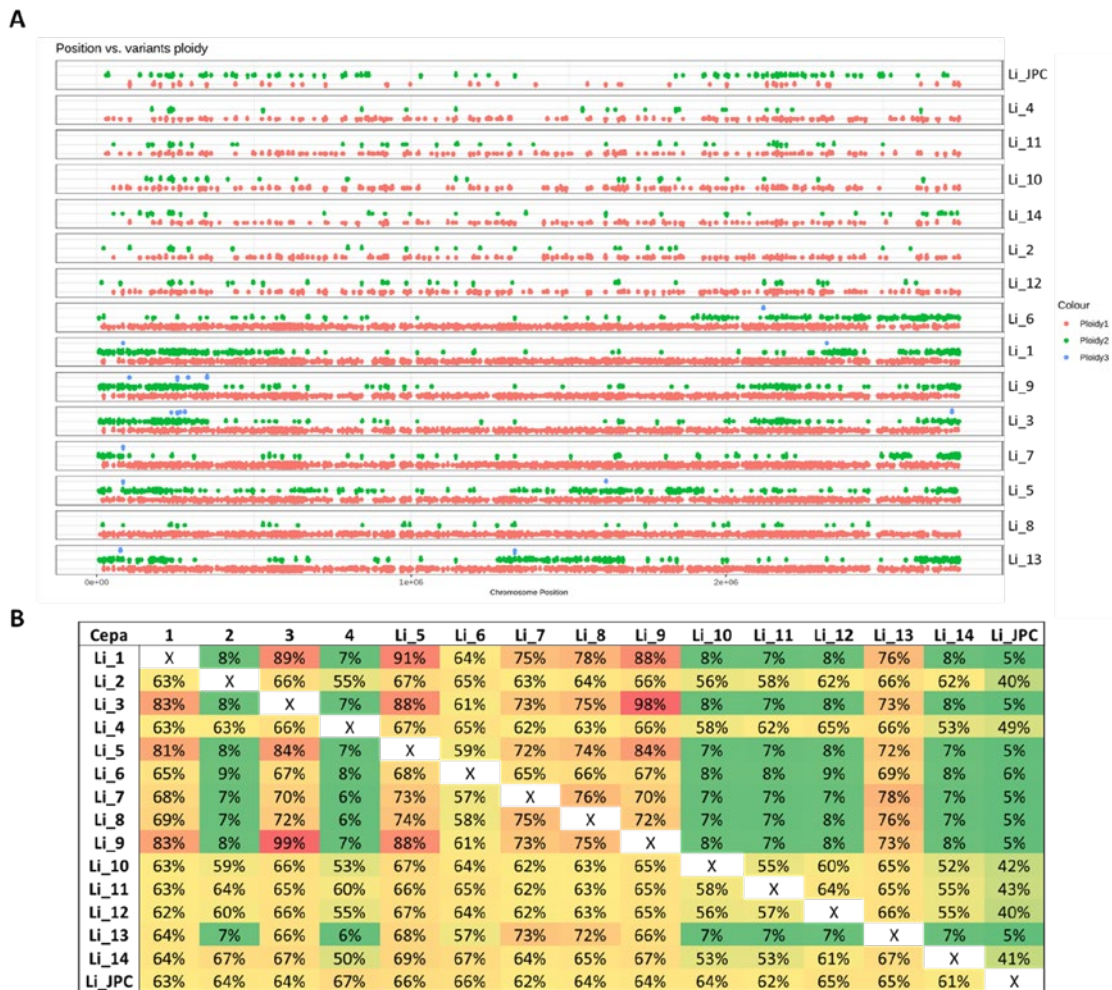


El análisis filogenético de los maxicírculos de las cepas de *L. infantum* presentes en el brote ha mostrado la existencia de dos grupos claramente diferenciados. En uno de ellos se incluye la cepa de referencia JPCM5 y cepas clínicas procedentes de Brasil, España y el norte de África ([Figura 6B](#)). El otro grupo acumula un total de 17 cambios en la secuencia codificante del maxicírculo y está formado exclusivamente por cepas del brote, en su mayoría con genotipo ITS-2 Lombardi ([Tabla 1](#)). Este grupo es evolutivamente distinto al de la JPCM5 y tiene algunas posiciones comunes con otras especies y genotipos epidemiológicamente interesantes encontrados en brotes de leishmaniasis en el Mediterráneo oriental ([13](#)).

### Análisis de sitios polimórficos y huella genómica

Otra aproximación *NGS* para una tipificación molecular consiste en seleccionar y comparar todas aquellas posiciones en el genoma que sean polimórficas, esto es, que presenten alguna variabilidad, ya sea un cambio de nucleótido, inserciones o deleciones ([Figura 7](#)). Esta comparativa global del genoma posibilita la caracterización inequívoca de cada aislado clínico, pues dos cepas aisladas del mismo paciente en distinto momento (tras una recaída, por ejemplo) muestran un porcentaje de similitud en las posiciones polimórficas mayor entre ellas que con cualquier otra cepa. Se trata, por lo tanto, de obtener una firma molecular que puede utilizarse para genotipar una cepa de manera individual y, por tanto, poder también distinguir una leishmaniasis debido a una recaída o debido a una reinfección ([Figura 7B](#)).

**Figura 7. Huella genómica de *L. infantum*. A) Se muestra el posicionamiento de los sitios polimórficos y el número de variables en cada posición en el cromosoma 1 de *L. infantum* de varias cepas clínicas y la cepa de referencia JPCM5. Las cepas distribuyen en dos grupos claramente diferenciados según el número de estos sitios polimórficos. Las cepas 3 y 9 tienen una huella genómica muy similar, debido a que fueron obtenidas del mismo paciente con una diferencia de tres meses. B) Comparativa de la huella genómica, indicándose el porcentaje de sitios polimórficos comunes en el genoma de distintas cepas de *L. infantum*.**



Además, este análisis ha permitido clasificar las cepas clínicas en función de otro parámetro genético: el número de sitios polimórficos. Mientras que un grupo de cepas, entre las que se incluye JPCM5, tiene un número moderado o bajo de sitios polimórficos, el otro grupo tiene hasta 10 veces más (Tabla 1). Este segundo grupo incluye mayoritariamente a las cepas del genotipo ITS-2 Lombardi y B, y un maxicírculo distinto al de JPCM5. La correlación no es total, pues las cepas 10 y 11 con genotipo Lombardi y maxicírculo distinto al de JPCM5 (y la cepa 1 que ITS-2 Lombardi con maxicírculo JPCM5) tienen un elevado número de polimorfismos.

Esto podría ser el resultado de la existencia de fenómenos evolutivos y de hibridación activos durante el brote de leishmaniasis.

**Tabla 1. Tipificación de aislados clínicos de *Leishmania* mediante tres aproximaciones NGS. Se indica si la cepa procede de un caso de leishmaniasis visceral (LV) o cutánea (LC) y si el paciente está coinfectado o no con VIH, o no está determinado (ND).**

Aislado clínico	Leishmaniasis	Inmunosupresión	Genotipo ITS-2	Genotipo maxicírculo	N.º polimorfismos
1	LV	ND	Lombardi	JPCM5	ALTO
2	LV	NO VIH	A	JPCM5	BAJO
3	LV	VIH	A	JPCM5	BAJO
4	LV	VIH	A	JPCM5	BAJO
5	LV	VIH	A	JPCM5	BAJO
6	LV	NO VIH	A	JPCM5	BAJO
7	LV	ND	A	JPCM5	BAJO
8	LC	ND	A	JPCM5	BAJO
9	LC	ND	A	JPCM5	BAJO
10	LV	ND	A	JPCM5	ALTO
11	LV	ND	A	JPCM5	ALTO
12	LV	NO VIH	A	JPCM5	BAJO
13	LV	VIH	A	JPCM5	BAJO
14	LV	VIH	A	JPCM5	BAJO
15	LV	VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
16	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
17	LV	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
18	LC	ND	B	NO-JPCM5	ALTO
19	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
20	LV	VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
21	LC	NO VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
22	LV	NO VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
23	LV	NO VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
24	LV	NO VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
25	LV	NO VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
26	LV	NO VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
27	LV	VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO

**Tabla 1. Tipificación de aislados clínicos de *Leishmania* mediante tres aproximaciones NGS. Se indica si la cepa procede de un caso de leishmaniasis visceral (LV) o cutánea (LC) y si el paciente está coinfectado o no con VIH, o no está determinado (ND).**

28	LV	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
29	LV	VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
30	LV	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
31	LV	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
32	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
33	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
34	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
35	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
36	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
37	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
38	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
39	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
40	LC	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
41	LV	VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
42	LV	ND	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
43	LV	VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
44	LV	VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
45	LV	NO VIH	Lombardi	NO-JPCM5	ALTO
46	LV	NO VIH	Lombardi	Non-JPC	ALTO
47	LV	VIH	Lombardi	Non-JPC	ALTO

En definitiva, las estrategias *NGS* son cada vez más requeridas para realizar análisis genotípicos. Esto se debe a que los métodos de tipificación basados en una o unas pocas dianas moleculares suelen ser ineficientes en la discriminación de organismos relacionados a nivel de especie, y aquellos que incluyen muchos marcadores pueden ser inviables si es necesario secuenciarlos uno a uno en cada aislado clínico (14). Sin embargo, con las aproximaciones basadas en *NGS* es posible reunir información más que suficiente para realizar un genotipado preciso e incluso secuenciar el genoma completo a distintos niveles de profundidad, aunque es necesario ajustar la complejidad del análisis y el coste de la secuenciación según las necesidades de cada caso. En este sentido, la secuencia del maxicírculo contiene suficiente información no solo para distinguir entre especies muy relacionadas, sino también para discriminar entre distintos grupos de cepas dentro de la misma especie, con un rendimiento

superior al de técnicas clásicas y, muy similar al que puede obtenerse mediante la secuenciación del genoma completo (15). Además, mientras que los análisis del genoma completo son complejos y requieren de grandes recursos computacionales y de almacenamiento, el manejo de la secuencia del maxicírculo es mucho más accesible.

Los resultados obtenidos tras el análisis filogenético de las cepas del brote (y otras *L. infantum*) mediante estas aproximaciones NGS indican que aunque *L. infantum* se ha considerado históricamente un grupo monofilético, a diferencia de lo que ocurre con la otra especie del complejo *L. donovani* (16), en realidad existe una importante variabilidad intraespecífica que afecta a la Cuenca Mediterránea y que está relacionada con la aparición de brotes epidémicos o formas clínicas poco habituales en algunas regiones (13). El elevado número de sitios polimórficos presente en esta población de parásitos, asociada con la mayoría de los casos del brote de leishmaniasis, puede deberse a un estado evolutivo muy activo en estas cepas, posiblemente relacionado con la incorporación de liebres y conejos en su ciclo vital (12). Por otro lado, el grupo con menor número de sitios polimórficos y un origen mitocondrial similar al de la cepa JPCM5 podría ser responsable de los casos en los que habitualmente el perro actúa como reservorio. Para establecer estas asociaciones entre los genotipos, los hospedadores, el estado inmunológico de los individuos y el tipo de leishmaniasis es necesario ampliar el número de cepas secuenciadas y la información clínica de los casos de leishmaniasis. No obstante, gracias a los datos recogidos durante este brote y al desarrollo de la metodología descrita ya es posible identificar las poblaciones de *L. infantum* en la región, analizar su distribución y poder realizar un seguimiento en un programa de vigilancia epidemiológica.

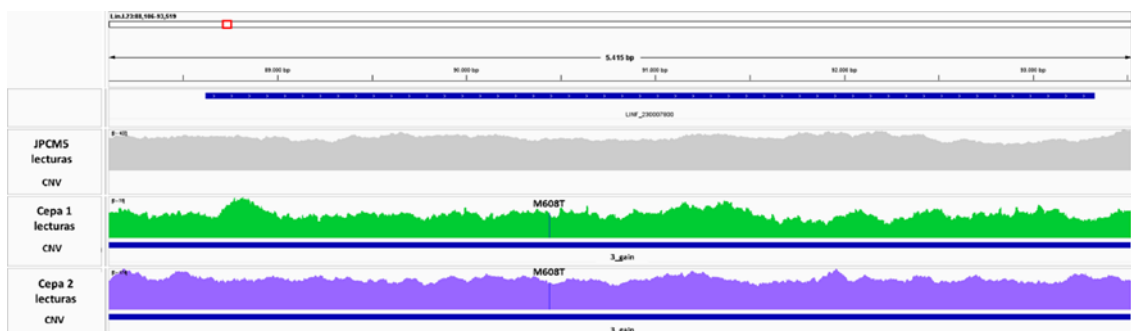
### Perfil genético asociado con la infectividad o virulencia

Además de la caracterización molecular dirigida a la tipificación de los aislados clínicos, la secuenciación del genoma completo permite estudiar el conjunto de características presentes en el ADN asociadas con la infectividad y virulencia de las cepas de *Leishmania* aisladas en el brote. Por su especial relevancia destacan aquellas relacionadas con la resistencia farmacológica. La aparición de resistencias al tratamiento es un problema recurrente que aumenta de forma progresiva en los brotes de leishmaniasis y que se deriva del aumento en el número de casos, el limitado número de fármacos disponibles y el fracaso terapéutico, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. Estos individuos, a pesar del tratamiento, no son capaces de controlar eficazmente la multiplicación de los parásitos y requieren de varias rondas de tratamiento o su mantenimiento de forma profiláctica, lo que propicia la aparición de la resistencia. Esto se ve favorecido por la plasticidad genómica innata de *Leishmania*, que puede acumular numerosas variaciones en su ADN con

las que poder adaptarse a los cambios ambientales drásticos que ocurren durante su ciclo vital y a la presencia de fármacos antiparasitarios (17). Estas variaciones van desde mutaciones en la secuencia, inserciones y deleciones, hasta reorganizaciones estructurales, el aumento o disminución en el número de copias de algunos genes implicados en los mecanismos de resistencia, de las regiones cromosómicas que los contienen o incluso del cromosoma completo (cambios en la ploidía) (Figura 4). Debido a que en *Leishmania* no existe una verdadera regulación de la transcripción, estas variaciones en el número de copias se relacionan directamente con la abundancia de sus transcritos y, por lo tanto, suelen traducirse en cambios de la expresión génica que pueden conducir a la adquisición de la resistencia (18). Además, los cambios en el ADN tienen más probabilidades de mantenerse y ser transmitidos de un hospedador a otro, favoreciendo la selección de fenotipos resistentes. Algunos de estos fenómenos en cepas del brote de leishmaniasis proceden de pacientes que han sufrido recaídas de forma recurrente y en los que existe una sospecha de fallo terapéutico y resistencia farmacológica (Figura 8).

Estos estudios conducen a lo que se ha denominado en la Estrategia Nacional de Medicina de Precisión como medicina genómica o medicina personalizada en el campo de las enfermedades infecciosas. Junto con el estudio de la respuesta inmunitaria del individuo, y el análisis complementario que se describe a continuación para determinar *in vitro* la resistencia farmacológica de estas cepas, es posible proporcionar información valiosa para ayudar a tomar decisiones sobre el tratamiento, el manejo de los pacientes y el abordaje epidemiológico más adecuado (Figura 1).

**Figura 8. Cambios genómicos en genes asociados con la resistencia farmacológica. Se muestra el alineamiento de las lecturas NGS dos cepas clínicas de *L. infantum* procedentes de pacientes que sufren recaídas de forma frecuente y con un alto riesgo de fallo terapéutico. En la región correspondiente con el gen MRPA relacionado la resistencia farmacológica se indica la existencia en estas dos cepas de una mutación y un aumento en el número de copias del gen (CNV) con respecto a la cepa de referencia.**



## CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS NIVELES DE RESISTENCIA FARMACOLÓGICA EN CEPAS DE *LEISHMANIA*

Como ya se ha mencionado, una de las complicaciones del tratamiento de la leishmaniasis humana es la capacidad del parásito de adquirir resistencias a uno o varios de los fármacos leishmanicidas disponibles en la actualidad, entre los que se encuentran los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B liposomal, la paromomicina o la miltefosina (19), conduciendo en muchos casos a un fallo terapéutico. Además, la continua circulación de cepas de *Leishmania* entre reservorios e individuos infectados conlleva la distribución de esta resistencia antimicrobiana adquirida. Esta situación constituye un importante problema de salud pública, especialmente en áreas endémicas de la enfermedad en las que se administran estos fármacos tanto en pacientes como en reservorios domésticos, tal y como ocurre en el área afectada por el brote. Además, este riesgo se ve incrementado en aquellos pacientes que presentan un sistema inmunitario debilitado (pacientes coinfectados con VIH o con tratamientos inmunosupresores debido a enfermedades autoinmunes o un trasplante), ya que en ellos el control de la infección se dificulta, permitiendo la multiplicación del parásito y condicionando la eficacia de los tratamientos. Como consecuencia, en estos casos el riesgo de recaídas tras las primeras pautas de tratamiento es mayor, necesitando así de nuevos tratamientos para hacer frente a esta situación, lo que posibilita la aparición de múltiples resistencias (20).

La caracterización fenotípica o estudio de los niveles de resistencia farmacológica permite analizar, tanto en la forma extracelular del parásito o promastigote como en la intracelular o amastigote, la actividad leishmanicida de los tratamientos empleados en la práctica clínica actual. El objetivo de esta técnica consiste en determinar la susceptibilidad de las cepas de *Leishmania* a estos fármacos a través del cálculo del valor de  $EC_{50}$ , o concentración efectiva máxima a la que un fármaco es capaz de producir el 50% de su efecto, mediante la realización de curvas de dosis-respuesta. Una vez conocidos los valores de  $EC_{50}$  en promastigotes y amastigotes de las cepas de *Leishmania* circulantes, se pueden comparar con los obtenidos en las cepas de referencia (sensibles a estos tratamientos). De esta forma, se pueden clasificar las distintas cepas clínicas como:

- Susceptibles al fármaco (S). Si presentan valores de  $EC_{50}$  menores al límite inferior de concentración de la cepa de referencia.
- Resistentes al fármaco (R). Al presentar valores de  $EC_{50}$  mayores que los del límite superior de concentración de la cepa de referencia.

Gracias a esta herramienta y, junto con los análisis genéticos descritos anteriormente, se está pudiendo analizar y caracterizar el perfil de resistencia de las

cepas clínicas de *Leishmania* aisladas de individuos infectados en el pasado brote de leishmaniasis así como de nuevos casos clínicos que se siguen produciendo en la actualidad ([Figura 1](#)). El objetivo de la introducción de este estudio fenotípico de la resistencia farmacológica en el Laboratorio de Leishmaniasis del Centro Nacional de Microbiología es dar apoyo y soporte al Sistema Nacional de Salud en el tratamiento de los casos clínicos de leishmaniasis, con especial atención en aquellos más complejos que presentan constantes recaídas y fallos terapéuticos. En estos casos, los resultados obtenidos, además de indicarnos si las cepas son más o menos resistentes que la cepa de referencia en el laboratorio (JPCM5), permiten determinar si ha habido cambios en el perfil de resistencia entre las distintas pautas de tratamiento. Además, y dado que en muchos de los casos existen mecanismos de resistencias comunes entre dos o más agentes leishmanicidas, estos ensayos permiten ayudar en la toma de decisiones sobre el tratamiento de elección en casos de fallo terapéutico.

De este modo, se han establecido distintos perfiles fenotípicos a los cuatro fármacos más empleados en la clínica actual en 9 aislados clínicos procedentes del brote de leishmaniasis ([Tabla 2](#)).

**Tabla 2. Porcentajes de resistencia y susceptibilidad en promastigotes de aislados clínicos del brote de leishmaniasis.**

	Resistentes	Susceptibles
<b>Antimonio</b>	30,76 %	69,23 %
<b>Anfotericina B</b>	76,92 %	23,07 %
<b>Paromomicina</b>	76,92 %	23,07 %
<b>Miltefosina</b>	69,23 %	30,76 %

Actualmente, el tratamiento de primera línea de elección para la leishmaniasis visceral en la Cuenca Mediterránea es la anfotericina B liposomal que, además, en muchos casos se administra de forma combinada junto con la miltefosina ([21](#)). Esta situación explica los elevados niveles de resistencia encontrados frente a ambos fármacos en los aislados clínicos del brote.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, el análisis del fenotipo de los parásitos aislados de pacientes que han sufrido recaídas tras varias pautas de tratamiento es muy útil para elegir el fármaco más adecuado. Como se puede observar en la [Tabla 3](#), la resistencia farmacológica entre las cepas del mismo paciente va variando según el tratamiento que se haya administrado a lo largo del tiempo. En el caso del paciente A, la cepa se vuelve prácticamente resistente a todos los tratamientos (incluido al que previamente era sensible, donde adquiere un perfil de resistencia intermedio

(I); hecho que podría indicar una posible nueva recaída de la enfermedad por reducción de la eficacia de los mismos. Por el contrario, la cepa del paciente B en el momento de la recaída, presentó una mayor susceptibilidad a dos de los tratamientos leishmanicidas, lo que sugiere que, una vez instaurado el tratamiento adecuado, la situación del paciente podría verse mejorada.

**Tabla 3. Estudio fenotípico de cepas de *Leishmania* procedentes de dos pacientes que sufrieron recaída clínica de la enfermedad.**

	Antimonio	Anfotericina B	Paromomicina	Miltefosina
Paciente A	S	R	R	R
Recaída A	I	R	R	R
Paciente B	I	R	R	R
Recaída B	S	I	S	R

Los resultados obtenidos de las cepas en circulación durante el brote de leishmaniasis han permitido determinar que la mayoría presentan un perfil de resistencia farmacológica a, al menos, dos agentes leishmanicidas. La combinación de estos resultados junto con el análisis genético de los aislados clínicos determinará si este perfil de resistencia puede estar fijado en algunos genotipos, pudiendo entonces seleccionar el tratamiento más adecuado para combatirlos y así prevenir tanto posibles fallos terapéuticos como la emergencia de resistencias.

## INCORPORACIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS EN EL DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS LEISHMANICIDAS

El brote comunitario de leishmaniasis, declarado en el suroeste de la Comunidad de Madrid en 2009, constituye una gran oportunidad para incrementar el potencial predictivo de los ensayos de cribado de compuestos e impulsar la búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas.

Actualmente, el tratamiento de la leishmaniasis se sustenta en un reducido número de fármacos con un uso restringido a causa de su toxicidad, coste, ruta de administración y aparición de resistencias. Necesitamos, por tanto, desarrollar nuevos compuestos que permitan superar estas limitaciones y ampliar el arsenal terapéutico disponible en la lucha frente a esta enfermedad (22, 23). La búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas se ha centrado principalmente en identificar compuestos activos frente a cepas de referencia como *L. donovani* BOB (MHOM/SD/62/1S-CL2D) y *L. infantum* BCN 150 (MCAN/ES/96/BCN 150) (24-28). Sin embargo, ¿son estas cepas, aisladas hace varias décadas y que han sido mantenidas

en laboratorios de todo el mundo desde entonces, verdaderamente representativas de la situación clínica actual?

En el año 2018, Hefnawy y colaboradores compararon la actividad antiparasitaria mostrada por 130 compuestos frente a la cepa de referencia *L. donovani* BOB, aislada en Sudán en 1962, y frente a dos cepas aisladas de pacientes de leishmaniasis visceral en Nepal en el año 2003. Estos autores observaron que el 55 % de los compuestos activos frente a la cepa de referencia perdieron su actividad frente al menos uno de los dos aislados clínicos empleados. Demostrando experimentalmente, por primera vez, que las cepas de referencia utilizadas no representan, en términos de susceptibilidad a fármacos, la situación clínica actual y que, por tanto, es necesario disponer de cepas que si la reflejen (27).

Es en este punto en el que la labor llevada a cabo por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de aislar, conservar y caracterizar cepas, durante la declaración del brote de leishmaniasis, adquiere gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos leishmanicidas. A lo largo de estos años, el ISCIII ha aislado de pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos, un total de 671 cepas, de las cuales 484 se corresponden a pacientes con leishmaniasis visceral (LV) y 187 a pacientes con leishmaniasis cutánea (LC). De estas 671 cepas, solamente 159 fueron aisladas en el área afectada por el brote, 46 de ellas se corresponden a casos de LV y 113 a casos de LC. Esta colección de cepas no solo proporciona una muestra de la diversidad genética y fenotípica presente en la actualidad en España, sino que también ofrece información sobre la virulencia y relevancia epidemiológica de las cepas incluidas en ella, al conocer su respuesta a los tratamientos clásicos en pacientes tanto inmunodeprimidos como inmunocompetentes.

A pesar de que colecciones de cepas, como la elaborada por el ISCIII, han estado disponibles durante años, los investigadores han evitado su uso en cribados de alto rendimiento debido a que, a diferencia de lo que ocurre con las cepas adaptadas al laboratorio, estandarizar el comportamiento *in vitro* de aislados clínicos es complicado y requiere la optimización del ensayo para cada una de las cepas de interés. En cambio, sí es factible su incorporación en fases posteriores del proceso de desarrollo de fármacos como una herramienta de validación y/o un paso adicional de selección (23,27).

En conclusión, incluir en las futuras campañas de cribado la evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos identificados frente a un amplio panel de aislados clínicos como un nuevo criterio de selección ayudaría a reducir el riesgo de fallo terapéutico, permitiendo: i) confirmar la eficacia antiparasitaria de los nuevos compuestos en cepas caracterizadas clínicamente, y que actualmente están en circulación; ii) estimar el riesgo de resistencias cruzadas, al comparar su actividad en

cepas resistentes y sensibles a los fármacos actuales; y iii) determinar qué población se beneficiaría de su uso al conocer si su actividad es específica de una determinada especie o región geográfica (23,27).

## REFERENCIAS

1. Carrillo E, Moreno J. Editorial: Biomarkers in Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:388.
2. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066.
3. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 2019;8(7).
4. They C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581-93.
5. Silverman JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, Kelly I, *et al.* Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2010;185(9):5011-22.
6. Dong G, Filho AL, Olivier M. Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite Leishmania. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:100.
7. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med.* 2015;36(1):11-7.
8. Gonzalez-de la Fuente S, Peiro-Pastor R, Rastrojo A, Moreno J, Carrasco-Ramiro F, Requena JM, *et al.* Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and de novo assembly into 36 contigs. *Scientific reports.* 2017;7(1):18050.
9. Camacho E, González-de la Fuente S, Solana JC, Tabera L, Carrasco-Ramiro F, Aguado B, *et al.* *Leishmania infantum* (JPCM5) Transcriptome, Gene Models and Resources for an Active Curation of Gene Annotations. *Genes.* 2023;14(4):866.

10. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and Infection*. 2005;7(11):1224-34.
11. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, Garcia E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013;18(30):20545.
12. Molina R, Jimenez MI, Cruz I, Iriso A, Martin-Martin I, Sevillano O, *et al.* The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*. 2012;190(1-2):268-71.
13. Solana JC, Chicharro C, Garcia E, Aguado B, Moreno J, Requena JM. Assembly of a Large Collection of Maxicircle Sequences and Their Usefulness for *Leishmania* Taxonomy and Strain Typing. *Genes (Basel)*. 2022;13(6).
14. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*. 2011;138(4):405-25.
15. Kaufer A, Stark D, Ellis J. A review of the systematics, species identification and diagnostics of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. *International Journal for Parasitology*. 2020;50(6):449-60.
16. Franssen SU, Durrant C, Stark O, Moser B, Downing T, Imamura H, *et al.* Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. *Elife*. 2020;9.
17. Requena JM. The Stressful Life of pathogenic *Leishmania* species. In: Requena JM, editor. *Stress Response in Microbiology*: Caister Academic Press; 2012. p. 323-46.
18. Rastrojo A, Garcia-Hernandez R, Vargas P, Camacho E, Corvo L, Imamura H, *et al.* Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018;8(2):246-64.
19. Sundar S, Singh B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(6):467-86.
20. van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(4):286-99.
21. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. WHO technical report series 2010;949.

22. Balana-Fouce R, Perez Pertejo MY, Dominguez-Asenjo B, Gutierrez-Corbo C, Reguera RM. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. *Drug Discov Today*. 2019;24(5):1209-16.
23. Hefnawy A, Berg M, Dujardin JC, De Muylder G. Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. *Trends Parasitol*. 2017;33(3):162-74.
24. Calvo-Alvarez E, Stamatakis K, Punzon C, Alvarez-Velilla R, Tejeria A, Escudero-Martinez JM, *et al*. Infrared fluorescent imaging as a potent tool for in vitro, ex vivo and in vivo models of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003666.
25. De Rycker M, Hallyburton I, Thomas J, Campbell L, Wyllie S, Joshi D, *et al*. Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):2913-22.
26. Dominguez-Asenjo B, Gutierrez-Corbo C, Alvarez-Bardon M, Perez-Pertejo Y, Balana-Fouce R, Reguera RM. Ex Vivo Phenotypic Screening of Two Small Repurposing Drug Collections Identifies Nifuratel as a Potential New Treatment against Visceral and Cutaneous Leishmaniasis. *ACS Infect Dis*. 2021;7(8):2390-401.
27. Hefnawy A, Cantizani J, Pena I, Manzano P, Rijal S, Dujardin JC, *et al*. Importance of secondary screening with clinical isolates for anti-leishmania drug discovery. *Sci Rep*. 2018;8(1):11765.
28. Pena I, Pilar Manzano M, Cantizani J, Kessler A, Alonso-Padilla J, Bardera AI, *et al*. New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource. *Sci Rep*. 2015;5:8771.

## Reseñas biográficas de los coordinadores de los capítulos



### **Dr. Ricardo Molina**

Unidad de Entomología Médica, LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)

*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

**R**icardo Molina es doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid (1994). En 1979 inicia su trayectoria profesional como Auxiliar de Investigación en Laboratorio en el Instituto de Salud Carlos III, donde consigue la plaza de investigador en 1985. Desde ese año y hasta su jubilación en 2023 ha liderado el Laboratorio de Entomología Médica. Tiene una amplia experiencia en entomología médica, asesorando al Ministerio de Sanidad (CCAES) y a Consejerías de Sanidad de Comunidades Autónomas, sobre vigilancia y control de artrópodos transmisores de enfermedades vectoriales. Es miembro del directorio de expertos en vectores de enfermedades del ECDC. Sus primeros años como investigador los dedicó a los anofelinos vectores del paludismo, en España y en Guinea Ecuatorial. El grueso de su carrera profesional la ha dedicado a investigar los flebotomos vectores de leishmaniasis, liderando o colaborando en proyectos nacionales e internacionales realizados en España, Panamá, Bolivia, Francia, Etiopía, Sudán y Bangladés. En los últimos años ha estado involucrado además en programas de vigilancia en España de vectores de la leishmaniasis, en especial en el brote de Fuenlabrada, y de virus causantes de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo y del dengue. También en la vigilancia en puertos y aeropuertos de mosquitos exóticos invasores, especialmente de *Aedes albopictus*. En su etapa final ha coliderado un proyecto AESI sobre vectores de arbovirosis y ha formado parte del grupo de investigación CIBERINFEC. Ha publicado cerca de 150 artículos en revistas nacionales e internacionales y ha aportado numerosas contribuciones a congresos internacionales y nacionales.



### **Dr. Javier Moreno**

Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)  
*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

Javier Moreno es licenciado con grado (1988) y doctor (1994) en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid. Ha estado 10 años como investigador postdoctoral en el Laboratorio de Leishmaniasis del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III – ISCIII (1994-2004) y posteriormente se incorporó como Investigador del Programa Ramón y Cajal al Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (2005- 2008). Entre 2007 y 2010 fue también Profesor Asociado de Microbiología (6h) en el Departamento de Biología Molecular de la UAM Desde finales de 2008 ha sido Científico Titular de OPI en el ISCIII y en febrero de 2021 obtuvo la plaza de Investigador Científico-A2 de OPI que ocupa actualmente Es responsable de la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, laboratorio que se encarga de realizar labores de diagnóstico clínico y referencia en leishmaniasis dando soporte al Sistema Nacional de Salud. Es investigador principal del grupo CB21/13/00018 de CIBERINFEC, además de liderar numerosos proyectos de investigación nacionales e internacionales sobre leishmaniasis, particularmente sobre inmunidad y vacunas. Desde mayo de 2015 hasta diciembre de 2020 ha sido responsable del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología en el Centro Nacional de Microbiología-ISCIII.

Javier Moreno dirige el *Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis* (ISCIII), que está encargado de dar soporte técnico a las actividades de formación, investigación y control que lleva a cabo la OMS en los países endémicos para esta enfermedad.



### **Dra. Lorena Bernardo**

Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid).

*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

**L**oren Bernardo es graduada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid (UCM), Máster Universitario en Microbiología aplicada a la Salud Pública e Investigación en Enfermedades Infecciosas por la Universidad de Alcalá de Henares (UAH) y doctora en Microbiología y Parasitología por la UCM en 2023.

En el año 2018 comenzó su actividad investigadora en la Unidad de Leishmaniasis, en el Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología. Desde entonces su línea de investigación se ha centrado en el estudio de los mecanismos celulares e inmunológicos implicados en la mayor severidad de la leishmaniasis visceral bajo condiciones de inmunosupresión farmacológica. Además, dentro de las actividades llevadas a cabo en la Unidad, se encarga de evaluar la resistencia farmacológica frente a los principales fármacos leishmanicidas, en cepas clínicas de *Leishmania* recuperadas de pacientes.

Ha participado en varios proyectos de investigación en leishmaniasis y sus trabajos han sido publicados en revistas de alto impacto, así como en revistas de divulgación tanto nacionales como internacionales.



**Dra. Eugenia Carrillo Gallego**

Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)  
*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

**E**ugenia Carrillo es licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada y doctora en Microbiología y Parasitología por la Universidad Complutense de Madrid. Ha sido investigadora postdoctoral en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), pero la mayoría de su carrera científica se ha desarrollado en el Instituto de Salud Carlos III en el Centro Nacional de Microbiología donde recientemente ha sido nombrada Científico Titular. Es miembro activo del Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis y de la Unidad de Leishmaniasis y enfermedad de Chagas, del Laboratorio de referencia e investigación en Parasitología. Su principal línea de trabajo e investigación se centra en el estudio de esta enfermedad olvidada, con 3 líneas principales de actividad científica: inmunidad y vacunas, leishmaniasis e inmunodepresión, y biomarcadores de cura y recaída para un tratamiento eficaz. Ha participado en más de 30 proyectos de investigación nacionales, europeos, y convenios con empresas privadas, dirigiendo 8 de estos proyectos. Ha publicado más de 60 artículos y revisiones científicas en PubMed, de los que más de la mitad se han publicado en revistas de alto impacto y son decil 1. Ha sido invitada a participar como ponente y en mesas redondas en numerosos congresos internacionales especializados.



### **Dra. Carmen Chicharro Gonzalo**

Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)  
*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

Carmen Chicharro Gonzalo es licenciada en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid. Tras la obtención de una beca FPI, realizó su Tesis Doctoral en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), disfrutando de tres estancias predoctorales en la Universidad de Yale (New Haven, CT. EEUU) y obteniendo el título de doctora en Farmacia por la UCM en 2000. Posteriormente, pasó a formar parte como personal postdoctoral, del Centro Colaborador de la OMS para la Leishmaniasis del Instituto de Salud Carlos III. En 2009 se incorporó como funcionaria de carrera a la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII) donde sigue desarrollando su actividad científica actualmente. Está involucrada fundamentalmente en el campo del diagnóstico molecular de la leishmaniasis, participando en diferentes proyectos de investigación, tanto nacionales como internacionales que tienen como principal objetivo tanto el diseño y desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico como la validación de los mismos. También participa en otros estudios relacionados con la caracterización del parásito y la epidemiología molecular de la enfermedad. Todos estos trabajos están reflejados en más de 50 publicaciones científicas y múltiples comunicaciones a congresos. Por otra parte, la doctora Chicharro mantiene una actividad docente participando en diversos cursos enfocados al diagnóstico de enfermedades infecciosas impartidos anualmente por la Escuela Nacional de Sanidad.



**Dr. Israel Cruz**

Departamento de Salud Internacional, Escuela Nacional de Sanidad, Instituto de Salud Carlos III, Madrid

Israel Cruz es Jefe del Departamento de Salud Internacional de la Escuela Nacional de Sanidad. Sus áreas de trabajo incluyen innovaciones e investigación de implementación para mejorar el acceso a la atención de las enfermedades tropicales desatendidas y enfermedades relacionadas con la pobreza. Actualmente, es miembro del Grupo Asesor Técnico y de Diagnóstico para las Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) de la OMS y preside el grupo de trabajo sobre diagnóstico y apoyo a laboratorios en relación a las ETD de la piel. Antes de incorporarse a la Escuela Nacional de Sanidad, dirigió los programas de leishmaniasis y úlcera de Buruli en la Foundation for Innovative New Diagnostics-FIND, Suiza. Durante muchos años ha sido miembro activo del Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis del ISCIII, España.



### **Fernando Fúster Lorán**

Área de Vigilancia de Riesgos Ambientales en Salud, Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental, Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid

**F**ernando Fúster Lorán es licenciado en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid en junio de 1992. Desde mayo de 1995 Funcionario de Carrera por oposición: Técnico Superior de Salud Pública (escala Veterinaria) de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Desde noviembre de 2012 Jefe de Área de Vigilancia de Riesgos Ambientales en Salud de la Dirección General de Salud Pública. Responsable de los programas relacionados con vigilancia de riesgos ambientales: zoonosis no alimentarias, vigilancia y control de vectores, polen, extremos térmicos, contaminación atmosférica, etc. Otros puestos desempeñados en la Administración: Jefe de Sección de Coordinación de Programas de Sanidad Ambiental e Higiene Alimentaria del Área IX, Jefe de Sección de Registro Sanitario de Alimentos, Jefe de Servicio de Garantía de Calidad en Salud Pública y Jefe de Área del Observatorio de Alimentación. Miembro del Comité organizador del Máster de Seguridad Alimentaria del Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid desde su primera edición en 2004. Miembro del Comité de Expertos Asesor en Enfermedades Emergentes de la Comunidad de Madrid desde 2018. Vocal de la junta de gobierno del Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid desde febrero de 2019.

Diplomado en Sanidad en 1997 y Máster en Salud y Medio Ambiente en 1999. Ha participado como docente en numerosas jornadas y cursos en materia de calidad, seguridad alimentaria, zoonosis y vectores con importancia en salud pública. A su vez tiene diversas publicaciones en las citadas materias.



### **Andrés Iriso**

Área de Vigilancia de Riesgos Ambientales en Salud, Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid

**A**ndrés Iriso es licenciado en Ciencias Biológicas. Trabaja como Técnico de Salud Pública en la Sección de Zoonosis de la Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental de la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid en la vigilancia de enfermedades emergentes y reemergentes en fauna silvestre y en la vigilancia de vectores, fundamentalmente de mosquitos y flebotomos. Ha presentado diversas comunicaciones en jornadas y congresos y publicaciones sobre vectores y fauna silvestre y ha participado como profesor en diversas acciones formativas sobre el tema.



**Dra. María Isabel Jiménez Alonso**

Unidad de Entomología Médica, LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)

*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

**M**aría Isabel Jiménez Alonso (Madrid, 1960) es doctora en Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (1994), premio extraordinario de doctorado «Abilio Rodríguez Paredes». Científica Titular en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Laboratorio de Entomología Médica, CNM, ISCIII desde marzo de 2006. En la actualidad es responsable de este laboratorio, donde desarrolla su actividad científica, en el campo de la biología molecular y otras áreas de conocimiento, centrada fundamentalmente en el modelo *Leishmania infantum* y su vector *Phlebotomus perniciosus*. Además, es Profesora Asociada en el Dpto. de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia (UCM), desde octubre de 2008. Cuenta con un total de 69 artículos publicados en revistas científicas, 5 capítulos de libros y la edición de un libro. Es coautora de una Patente galardonada con el Primer Premio del Concurso Madri+d a las mejores patentes registradas en 2007, con extensiones europea y americana concedidas. Por otro lado, ha realizado varias estancias en Centros de reconocido prestigio, como el IRD, Montpellier, Francia (2 meses) y el Wellcome Center of Molecular Parasitology, Universidad de Glasgow, Reino Unido (2 años y 3 meses). Forma parte del grupo de investigación CIBERINFEC (CB21/13/00110) del consorcio CIBER. Además, pertenece al equipo de expertos del ISCIII para la elaboración de Evaluaciones de Riesgo del CCAES (Ministerio de Sanidad y Consumo). Recientemente, ha sido designada por el CCAES «Operational Focal Point del ECDC sobre Vigilancia Entomológica». Por último, cuenta con 4 sexenios de evaluación de actividad investigadora, reconocidos por la CNEAI y 5 quinquenios.



**Dra. Inés Martín Martín**

Unidad de Entomología Médica, LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)

*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

**I**nés Martín Martín es doctora en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid (2014), y es Científica Titular en el Laboratorio de Entomología Médica, que forma parte del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, desde noviembre de 2021. Cuenta con más de 15 años de experiencia en el campo de la entomología médica. Se ha especializado en el estudio de los flebotomos y culícidos como vectores de la leishmaniosis y de diversas arbovirosis, respectivamente. Realizó su tesis doctoral en el Instituto de Salud Carlos III, acerca de la saliva de los flebotomos como herramienta frente al control de la leishmaniosis. Posteriormente desarrolló su trabajo postdoctoral en el *Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institutes of Health*, Estados Unidos, donde se centró en caracterizar funcionalmente componentes de la saliva de flebotomos y mosquitos. Resultado de su trabajo en el extranjero publicó más de 25 artículos científicos y obtuvo el prestigioso Premio a la Excelencia en Investigación (*NIH Fellows Award for Research Excellence-FARE- 2017*), entre otros méritos.



**Dra. Begoña Monge Maillo**

Centro de Referencia Nacional de Medicina Tropical, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

*Centro Colaborador de la OMS en el Manejo Clínico de Leishmaniasis*

**B**egoña Monge Maillo es doctora en Medicina y especialista en Medicina Interna. Trabaja como Facultativo Especialista de Área en el Centro de Referencia Nacional de Medicina Tropical del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. En 2019 trabajó como consultora para la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la vigilancia epidemiológica de *Leishmania* en el área europea y desde 2021 codirige el Centro Colaborador de la OMS en el Manejo Clínico de Leishmaniasis. Es además coordinadora de la Red Nacional de Leishmaniasis *ReNLeish*. Dentro de su faceta de médico investigador, obtuvo un contrato Río Hortega y posteriormente un contrato Juan Rodés y es investigadora principal de diversos proyectos de financiación pública competitiva y miembro del CIBER de Enfermedades Infecciosas.



### **Dr. Javier Nieto**

Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)  
*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

Javier Nieto se licenció en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid en 1981. Desde 1986 es funcionario del Ministerio de Sanidad, destinado inicialmente en la Escuela Nacional de Salud y posteriormente al Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, como Científico Titular. Desde 1986 hasta la actualidad es Colaborador Honorífico del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la UCM. En 1999 obtuvo el doctorado en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid. Ha realizado trabajos relacionados con un modelo de leishmaniasis canina experimental, trabajando con diferentes antígenos y adyuvantes como candidatos a vacuna, así como con diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad. Así mismo, ha trabajado en diferentes líneas de investigación sobre el diagnóstico y la epidemiología tanto de leishmaniasis como de la Enfermedad de Chagas. Ha sido responsable de diferentes ensayos clínicos de la vacuna frente a la leishmaniasis canina y actualmente es responsable de un proyecto de investigación que implica un ensayo clínico relacionado con la enfermedad de Chagas. Ha participado en diferentes expediciones científicas organizadas por la OMS para el control de la leishmaniasis en países de alta endemicidad. Ha colaborado en diferentes estudios sobre puesta a punto y validación de distintas pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas y participa en ensayos de Comparabilidad y Calidad.



**Dr. Juan Víctor San Martín López**

Área de Infecciosas del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Fuenlabrada (Madrid).

Juan Víctor San Martín López es licenciado y doctor en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid, con la Tesis Doctoral (M/TESIS/2988) «Endocarditis infecciosa sobre válvula protésica: relación entre sus características, el intervalo de tiempo entre la cirugía y el diagnóstico y el microorganismo causal». Residencia en Medicina Interna en el Hospital de la Princesa (Madrid). Máster en Enfermedades Infecciosas por la Universidad de Alcalá. Facultativo del Área de Infecciosas del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Fuenlabrada (Madrid) desde febrero de 2004 a la actualidad. Investigador de RICET (grupo Hospital de Fuenlabrada) desde enero de 2014 hasta diciembre de 2021, con línea principal de investigación en leishmaniasis y actualmente investigador adscrito al grupo CB21/13/00018 del CIBER de Enfermedades Infecciosas, CIBERINFEC.

Como facultativo asistencial de Infecciosas-Medicina Interna en el Hospital de Fuenlabrada, ha tenido la oportunidad de adquirir experiencia directa en el manejo clínico de la leishmaniasis visceral en los años que duró el brote de leishmaniasis declarado en su área desde 2009. Esta experiencia le ha permitido dirigir tres tesis doctorales de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid sobre este brote, analizando pacientes inmunocompetentes (Dr Luis Horrillo Sanchez de Ocaña Defensa: 28/10/2019), población inmunosuprimida no VIH (Dra Belén Matía Hernando Defensa: 29/04/2019) y población VIH (Dra Alicia Castro Gordon Defensa: 20/12/2016). Además, le ofreció la oportunidad de ejercer como WHO Consultant en el curso «Training of trainers on Leishmaniasis case management». Gaziantep, Turkey. Organización Mundial de la Salud (OMS Europa) 04/02/2019 - 08/02/2019. Finalmente, ha podido participar como ponente en varios congresos y reuniones sobre leishmaniasis, y ser autor de varios artículos centrados en leishmaniasis visceral.



**Dr. Jose Carlos Solana Morcillo**

Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, LRI Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid)

*Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis*

Jose Carlos Solana es licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid y doctor en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid. Desde 2013 ha desarrollado una actividad investigadora multidisciplinar sobre el parásito *Leishmania*, tanto a nivel de su biología molecular como en su interacción con el sistema inmunitario del hospedador. Actualmente trabaja con un contrato del CIBER de Enfermedades Infecciosas como investigador postdoctoral de la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas del Centro Nacional de Microbiología y del Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis. Entre sus líneas de trabajo destacan la búsqueda y evaluación de nuevos candidatos vacunales para la leishmaniasis, el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico, y el ensamblaje y anotación de los genomas de referencia de las distintas especies de *Leishmania* mediante aproximaciones genómicas, transcriptómicas y proteómicas. Parte de este trabajo se aborda en más 15 artículos científicos publicados en revistas internacionales y diversos artículos de divulgación.

