



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**ACTUALIZACIÓN DEL BROTE DE
LEISHMANIOSIS DE FUENLABRADA:
ESTUDIOS DEL VECTOR Y SU UTILIDAD EN
EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD**

Autor: Fernando Valladares Miguel
Tutor: María Isabel Jiménez
Alonso Convocatoria: Junio

INDICE	2
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
1.1- CICLO BIOLÓGICO Y TRANSMISIÓN.....	4
1.2- MANIFESTACIONES CLÍNICAS	6
1.3- SITUACION EPIDEMIOLOGICA DE LA LEISHMANIOSIS EN ESPAÑA	7
1.4- SITUACIÓN DE LA LEISHMANIOSIS EN LA COMUNIDAD DE MADRID... ..	7
2. OBJETIVOS	7
3. METODOLOGÍA.....	7
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	8
4.1- INICIO DEL BROTE	8
4.2- VIGILANCIA Y CONTROL DEL RESERVORIO: LIEBRE Y CONEJO	11
4.3- VIGILANCIA Y CONTROL DEL VECTOR.....	12
4.3.1 .MUESTREOS CON TRAMPAS ADHESIVAS Y TRAMPAS DE LUZ (CDC)	12
4.3.2. XENODIAGNÓSTICO	13
4.3.3. TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS EN EL ESTUDIO DEL BROTE.	14
4.3.3.1. DETECCIÓN DE <i>Leishmania</i> spp. EN <i>P. perniciosus</i>.....	14
4.3.3.2. ESTUDIO DEL ORIGEN DE LA SANGRE INGERIDA POR LAS HEMBRAS DE FLEBOTOMOS	15
4.3.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>Leishmania</i> spp.....	15
5. CONCLUSIONES	16
6. BIBLIOGRAFÍA	17

RESUMEN

En España, la leishmaniosis es una zoonosis hipoendémica presente en la mayor parte del territorio peninsular y en las Islas Baleares. *Leishmania infantum* es responsable tanto de las leishmaniosis cutáneas (LC) como de las leishmaniosis viscerales (LV) siendo el perro el principal reservorio. El vector responsable de la transmisión es un díptero del género *Phlebotomus* (Diptera: *Psychodidae*, *Phlebotominae*).

Desde el año 2010, se notificó un aumento de casos de leishmaniosis en humanos en cuatro municipios del suroeste de Madrid (Fuenlabrada, Getafe, Leganés y Humanes de Madrid), dando lugar al denominado “Brote de Leishmaniosis de Fuenlabrada”.

Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos estudios entomológicos en la zona, principalmente llevados a cabo por el Laboratorio de Entomología Médica del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en colaboración con la Comunidad de Madrid.

En este trabajo, se revisa la situación actual del brote así como la importancia en el estudio y control del vector en la enfermedad. Se ha reflejado el descubrimiento de nuevos reservorios - liebre y conejo - y, la actualización y puesta a punto de técnicas de detección del parásito.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La leishmaniosis comprende un grupo de enfermedades parasitarias causada todas ellas por parásitos del género *Leishmania* y transmitidas por flebotominos. En España la leishmaniosis es una zoonosis hipoendémica causada por *L. infantum*, presente prácticamente en todo el territorio peninsular y las Islas Baleares¹. En la actualidad, nuestro país es un claro exponente de la expansión de esta parasitosis y de la constatación de la leishmaniosis urbana como nueva forma de enfermedad ligada al mundo desarrollado².

En España el parásito que se identifica como causante de la enfermedad es *Leishmania infantum*, especie parasitaria capaz de infectar tanto a animales como a seres humanos¹. El vector responsable de la transmisión es un díptero del género *Phlebotomus* (Diptera: *Psychodidae*, *Phlebotominae*), conocido vulgarmente como flebotomo o mosquito de las arenas, cuyas hembras son de hábitos hematófagos y el reservorio más conocido es el perro².



Figura 1: Hembra de flebotomo alimentándose
(Fuente: Laboratorio de Entomología Médica, ISCIII)

La leishmaniosis fue incluida como Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en España en el año 1982³, aunque su vigilancia pasó a ser competencia de las Comunidades Autónomas desde 1997, año en el que se creó la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), con el Sistema de Notificación de Enfermedades de Declaración Obligatoria⁴. A partir de enero de 2014 la leishmaniosis ha pasado a ser considerada de nuevo una EDO a nivel nacional.

El brote de Leishmaniosis del suroeste de la Comunidad de Madrid, tanto desde el punto de vista epidemiológico como ambiental, es de gran complejidad y ha requerido del trabajo y la dedicación de muchos profesionales de diferentes organismos e instituciones, viéndose reflejado en un Plan de Acción Múltiple compuesto por vigilancia epidemiológica y entomológica, vigilancia de reservorios y protección de la población, haciendo especial énfasis en conseguir una máxima difusión de la información sobre medidas preventivas dirigida a la población de riesgo y a la población general⁵.

1.1- CICLO BIOLÓGICO Y TRANSMISIÓN

El ciclo de transmisión de *Leishmania* se inicia cuando una hembra de flebotomo ingurgita sangre de un vertebrado junto con macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania*. Estos se multiplican y se transforman en promastigotes en el tubo digestivo del díptero (metaciclogénesis). Los promastigotes pasan a la probóscide del insecto para su posterior inoculación a otro hospedador. Este ciclo dura de 4 a 10 días⁶.

Cuando la hembra de flebotomo vuelve a ingurgitar sangre de un vertebrado, inocula los promastigotes que son fagocitados por los macrófagos del tejido conectivo y, en el interior de los lisosomas de éstos, se produce la transformación a amastigote y su posterior multiplicación. En la transformación de promastigote a amastigote influyen varios factores,

siendo los más importantes la temperatura (35°C) y el pH. Los amastigotes se replican en los macrófagos y los destruyen e infectan progresivamente un número siempre mayor de fagocitos. La diseminación del parásito en el organismo del hospedador y el desarrollo de la enfermedad dependen del tipo y de la eficiencia de la respuesta inmunitaria del hospedador infectado⁶.

Solo las hembras de flebotomo se alimentan de sangre, y por tanto son las únicas transmisoras de la enfermedad⁶.

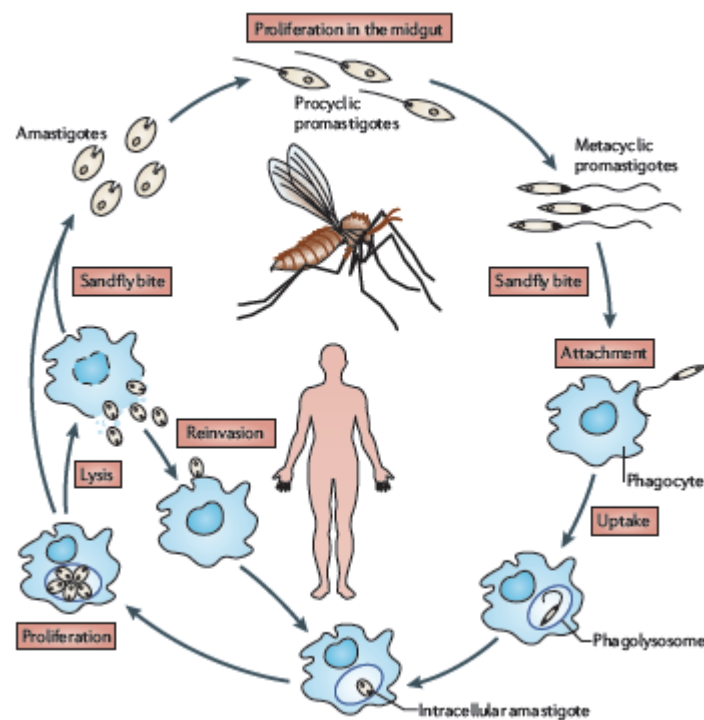


Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Fuente: Kaye *et al.*, 2011).

Las especies de flebotomos responsables de leishmaniosis en España son *Phlebotomus perniciosus* y en menor grado *Phlebotomus ariasi*.⁷

Los flebotomos ponen los huevos en lugares arenosos, en penumbra, húmedos, con temperatura constante y ricos en materia orgánica (madrigueras, huecos de los árboles, vertederos), condiciones ambientales generadas en la zona del suroeste de Madrid.

Estos dípteros requieren para su desarrollo temperaturas en torno a los 20 – 25°C y humedades relativas superiores al 90%. El periodo de actividad de la fase adulta se comprende entre los meses de mayo y octubre, pudiendo variar en función de las condiciones climáticas locales existentes. *P. perniciosus* presenta dos máximas de densidad de población

en los meses de julio y septiembre. Su máxima actividad es crepuscular y nocturna, siempre que las temperaturas superen los 16-18° C y la lluvia y el viento no estén presentes. Poseen un marcado fototropismo. Es típico su vuelo silente y limitado en su alcance a menos de 2 Km ⁶.

El área de distribución de la leishmaniosis está condicionada no solo por la presencia del flebotomo sino por su abundancia y por su afinidad. Por debajo de ciertos límites de densidad de población de los vectores no se mantiene la transmisión. De la misma manera existe una apetencia del flebotomo por algunas especies de vertebrados ⁶.

1.2- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las dos formas clínicas que produce *L. infantum* son la leishmaniosis cutánea y la leishmaniosis visceral.

La leishmaniosis visceral (kala-azar) se caracteriza por fiebre de duración intermedia y bien tolerada al inicio, pancitopenia y esplenomegalia. El periodo de incubación puede variar desde 10 días hasta 1-2 años, y el inicio de la enfermedad suele ser gradual. Además de los síntomas ya mencionados, es común la aparición de malestar general, escalofríos, pérdida de peso, anorexia, dolor en el hipocondrio izquierdo, diarrea o vómitos. Los signos fundamentales son pancitopenia e hipergammaglobulinemia con hipoalbuminemia. También, se produce una importante elevación de los reactantes de fase aguda y, en el brote de Fuenlabrada han sido particularmente llamativas las elevadas cifras de ferritina ⁷.

La leishmaniosis cutánea tiene como lesión característica para *L. infantum* la aparición de una pápula o nódulo en el lugar de la inoculación que crece lentamente y puede desarrollar una costra central que puede caerse y exponer una úlcera con un margen elevado y una induración circundante. El período de incubación es más breve que en la visceral, generalmente comprendido entre una semana y tres meses ⁸.

El brote de Fuenlabrada se ha caracterizado por el polimorfismo de las lesiones, con predominio de las pápulas sin costra con o sin descamación. Además, se han observado formas más atípicas: pápula eritemato-anaranjada, pápula eritematosa con lesión central y pápula eritematosa sin costra. La localización de las lesiones ha sido focalizada en las extremidades y la mayoría de los pacientes presentaba lesiones múltiples, en muchos casos alejadas entre sí ⁸.

1.3- SITUACION EPIDEMIOLOGICA DE LA LEISHMANIOSIS EN ESPAÑA

Desde 1996 a 2011 la red Nacional de Vigilancia epidemiológica (RENAVE) detectó 1.755 casos, con una incidencia media anual de 0,45 casos/100.000 habitantes. En este período las Comunidades Autónomas que notificaron casos fueron: Andalucía, Aragón, Baleares, Cantabria, Castilla-León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Madrid, Murcia, Navarra y La Rioja. Las mayores cifras de incidencia se registraron en Baleares, Valencia, Madrid, Andalucía y Cataluña ⁹.

1.4- SITUACIÓN DE LA LEISHMANIAOSIS EN LA COMUNIDAD DE MADRID

Durante el período 2000 - 2009 se informó de 12 a 25 casos anuales en la región de Madrid, con una tasa de incidencia en el año 2008 de 0,26 y en el 2009, de 0,23 por cada 100.000 habitantes.

Sin embargo, desde 2010 se observó un aumento inusual de casos de leishmaniosis visceral y cutánea en el suroeste de la comunidad. Principalmente en cuatro zonas urbanas: Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid. Entre 2010 y diciembre de 2016 se reportaron 708 casos humanos fueron reportados en esta zona, de los cuales el 38'6% se corresponden con casos de LV y el 61'4% a casos de LC. Fuenlabrada es la población más afectada, donde la incidencia media alcanzó 45,2 casos /100.000 habitantes¹⁰.

2. OBJETIVOS

El objetivo de éste trabajo ha sido realizar un estudio bibliográfico sobre los artículos publicados en relación al estudio del brote de Leishmaniosis localizado en el suroeste de la Comunidad de Madrid que comenzó en 2010 y definir su situación actual, puesto que aún no está extinguido.

Se pretende reflejar la importancia del estudio del vector de la leishmaniosis en la zona y su utilidad en el control de la enfermedad, la repercusión de las distintas técnicas de identificación del parásito en el vector y el alcance de la identificación del origen de la sangre ingerida por las hembras de flebotomos.

3. METODOLOGÍA

Se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos científicos publicados principalmente en la web internacional PubMed (motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE de citas y resúmenes de artículos de investigación biomédica), en los que se

han descrito la evolución del brote y las medidas adoptadas para su erradicación. Se han utilizado aquellos artículos y documentos más relevantes publicados en los últimos años y en particular los trabajos publicados por el Laboratorio de Entomología Médica del Instituto de Salud Carlos III (en adelante Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1- INICIO DEL BROTE

En 2010 el sistema de vigilancia epidemiológica de la Comunidad de Madrid detectó un incremento inusual de casos de leishmaniosis en habitantes de la zona suroeste de Madrid. El brote afectó fundamentalmente a ciudadanos de la localidad de Fuenlabrada, aunque también se registraron casos en otros tres municipios geográficamente cercanos: Leganés, Getafe y Humanes. Todos ellos presentan en común una característica medio ambiental: comparten amplios espacios de parques periurbanos de reciente construcción (Bosque Sur), los cuales proporcionan un hábitat adecuado para los flebotomos^{11,12}.

Durante los años 2010 a 2012, en el brote existió un considerable incremento en el número de casos declarados de leishmaniosis, alcanzando su máximo exponente durante el año 2012, en el que fueron notificados un total de 189 casos, lo que supuso el 71 % del total de casos declarados en España (266 casos)¹¹.

El estudio y análisis de las variables epidemiológicas del brote arrojó las siguientes conclusiones^{11,24}:

- Desde el 1 de julio de 2009 hasta el 2 de abril de 2012 se notificaron 299 casos de leishmaniosis con una tasa de incidencia de 30,64 casos por 100.000 habitantes.

- El 41,4% de los enfermos asociados al brote presentaron leishmaniosis visceral (110 casos, TI: 12,67) y el 58,6% restante una leishmaniosis cutánea (156 casos, TI: 17,97).

- El 58,3% son hombres. La mediana de la edad es de 48 años (41 años en viscerales y 52 en cutáneas) y el rango de edad es de 2 meses a 95 años. Destaca la aparición de 8 casos en menores de 1 año (7 con leishmaniosis visceral y uno con leishmaniosis cutánea) y 6 casos entre 12 y 23 meses (5 con leishmaniosis visceral y uno con leishmaniosis cutánea). Curiosamente, hasta el 70% de los casos se encontraron en pacientes inmunocompetentes (de edades comprendidas entre 46-60 años).

- La curva epidémica permitió plantear la hipótesis de que el problema en reservorio y/o vector se inició en el verano de 2009, tuvo su acmé en el verano de 2010 y continuó durante 2011.

- Solo el 32% de casos reconocen un contacto con perros en su entorno doméstico o peridoméstico y únicamente el 5% refieren haber tenido contacto con perros “enfermos”.

- A través de la encuesta epidemiológica no se pudieron detectar factores de riesgo ambientales clásicamente descritos que fueran determinantes.

- La investigación de otra fauna presente en la zona, conforme a los informes elaborados por el Instituto de Salud Carlos III indicaron que las liebres eran reservorios secundarios activos, al aislar en éstas, el parásito y confirmar que coincidía con el observado en los casos humanos. Mediante estudios de xenodiagnóstico se comprobó, además, la capacidad de las liebres y los conejos en transmitir el parásito al vector.^{15,16}

Se adoptaron medidas de control medio ambiental con la vigilancia del vector, por medio del desarrollo de un plan de muestreo en la zona de riesgo con la colocación, seguimiento y análisis de 1695 trampas adhesivas convencionales y de luz para flebotomos durante los meses de abril a octubre de 2011, monitorizándose 37 estaciones. Se identificó el vector, con el estudio de 10.161 especímenes, detectando un predominio de *P. perniciosus*. Además se estudió su densidad, encontrándose cifras elevadas (45,3 flebotomos /m², frente a la media de la Comunidad de Madrid, en torno a 30 flebotomos /m²). Además, se identificó *L. infantum* en más del 90% de los casos de leishmaniosis confirmados²².

Como conclusión última se expuso que la aparición del brote fue ocasionada por las modificaciones medio ambientales de la zona anteriormente mencionada, por una nueva red de carreteras nacionales y de la Comunidad de Madrid o la construcción de nuevos parques que, añadidos a la abundante presencia de liebres, pudieron producir un aumento de la población del flebotomos, lo que favoreció a un incremento en las infecciones producidas. Las principales fuentes de alimentación de los flebotomos, en orden de mayor preferencia, fueron las liebres, conejos, perros y seres humanos, existiendo un solapamiento de los ciclos de transmisión selvático y peridoméstico, con la peculiaridad de que en este escenario el perro no ha sido un reservorio clave para mantener la transmisión del ciclo de *L. infantum*¹⁴.

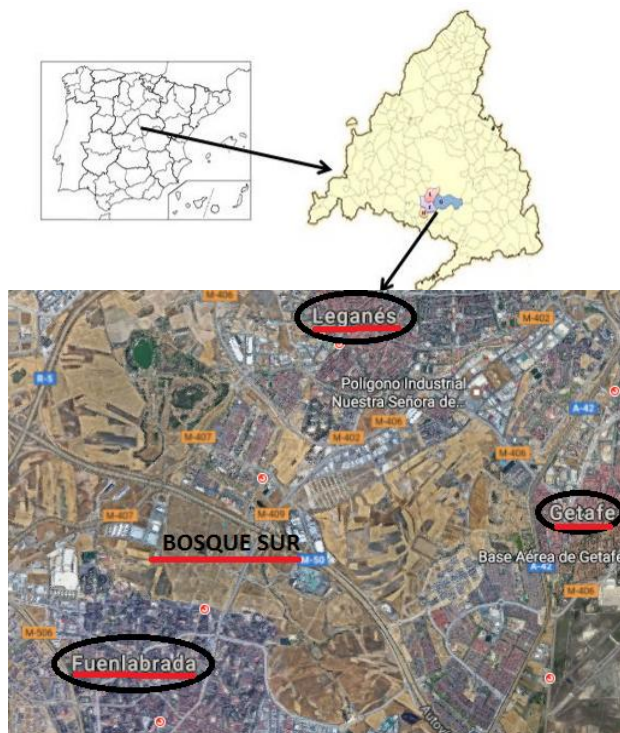


Figura 3. Localización de los municipios de la zona del brote: Fuenlabrada, Leganés y Getafe (Fuente: Google Maps)

En primer lugar se realizó la vigilancia y control del vector implicándose de forma coordinada los municipios y la Dirección General de Medio Ambiente; se puso en marcha un plan de lucha antivectorial ejecutado por empresas especializadas, incluyendo desinsectación en zonas de riesgo y zonas limítrofes, escombreras, vertederos, alcantarillado, parques aguas pluviales y el uso de insecticidas⁴.

Paralelamente se llevaron a cabo medidas de control del reservorio (animales de compañía y fauna silvestre) y, también medioambiental. Este plan recayó fundamentalmente sobre los ayuntamientos, incluyendo la identificación de zonas de riesgo, limpieza de restos vegetales, parcelas y parques, eliminación de madrigueras de roedores, limpieza de alcantarillado, eliminación de lodos, recogida de animales abandonados⁵.

En materia de comunicación, tanto la Consejería de Sanidad como los Ayuntamientos, realizaron una importante campaña de información y educación sanitaria dirigida a los ciudadanos y a los profesionales de la zona, difundiendo el protocolo de vigilancia y manejo de la enfermedad en las áreas, para garantizar que los médicos de atención primaria y especialistas consideraran el diagnóstico diferencial de leishmaniosis⁵.

Se realizó un especial énfasis en conseguir una máxima difusión de la información sobre medidas preventivas. Se repartieron folletos explicando cómo evitar la picadura del mosquito: alejamiento de las áreas que pudieran estar infestadas como Parque Polvoranca y

Bosque Sur, no permanecer al aire libre entre el anochecer y el alba en esos lugares, vestir ropas gruesas y holgadas, utilizar pantalones largos y camisas de manga larga, tratamiento de correcto de las ropas con repelentes aptos incluso para la edad pediátrica, uso de mosquiteras en puertas y ventanas de viviendas, etc ⁵.

4.2- VIGILANCIA Y CONTROL DEL RESERVORIO: LIEBRE Y CONEJO

La falta de correlación de la prevalencia entre la enfermedad en el reservorio principal, el perro, y ésta en pacientes humanos, provocó que los investigadores se plantearan la existencia de otros reservorios potenciales¹⁵.

Por tanto, se llevó a cabo una inspección preliminar que reveló una población de liebres y conejos muy elevada e inusual presente en el parque periurbano de nueva construcción. Este hecho sugirió la posibilidad de que dichos animales pudieran estar actuando como reservorios de *Leishmania* y ser los responsables de transmitir el parásito a los flebotomos en la zona^{16,17}.

Así, se demostró por primera vez mediante estudios de xenodiagnóstico que las liebres (*Lepus granatensis*) y los conejos (*Oryctolagus cuniculus*), seropositivos frente a *Leishmania*, y aparentemente sanos, eran capaces de infectar a *P. perniciosus*, el vector competente en la zona. Estos resultados, junto con hallazgos más recientes obtenidos mediante PCR, apoyaron la alta transmisión que estaba teniendo lugar en el área y que tanto las liebres como los conejos, en menor medida estaban teniendo un papel como reservorios en el ciclo de transmisión selvática^{16, 17}.



Figura 4. A) Presencia de gran población de conejos y liebres en Bosque Sur; B) Ensayos de Xenodiagnóstico (fuente: Laboratorio de Entomología Médica, ISCIII)

4.3- VIGILANCIA Y CONTROL DEL VECTOR:

4.3.1. Muestreos con trampas adhesivas y trampas de luz (CDC)

El laboratorio de Entomología Médica del ISCIII desarrolló un plan de muestreo en la zona de riesgo entre 2012 y 2014 con la colocación, seguimiento y análisis de trampas adhesivas convencionales y trampas de luz (CDC) para los flebotomos en 4 estaciones de muestreo situadas en la zona periurbana del municipio de Fuenlabrada (tres estaciones, nº 1, 2 y 3) y Leganés (una estación, nº 4) (Figuras 5 y 6).

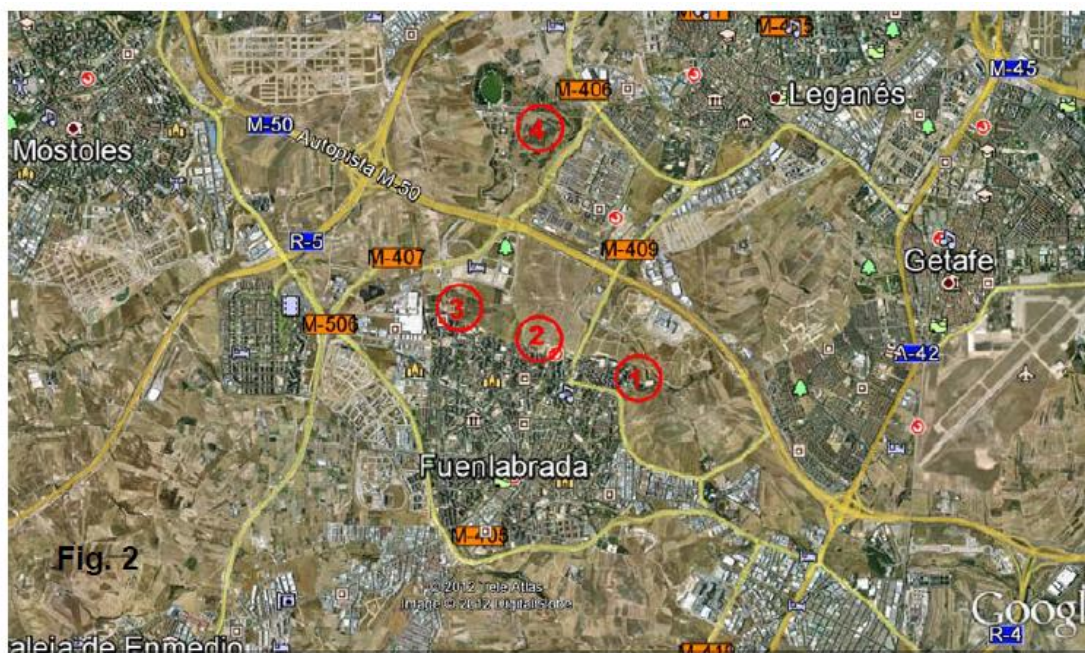


Figura 5. Estaciones de muestreo seleccionadas dentro del área de estudio: 1- Instituto de Educación Secundaria “Atenea” (La Avanzada, Fuenlabrada), 2- Centro de Educación Ambiental (Bosquesur, Fuenlabrada), 3- Colegio de Educación Especial “Sor Juana Inés de la Cruz” (Fuenlabrada), 4- Centro Educación Ambiental (Polvoranca, Leganés).

(Fuente: Laboratorio de Entomología Médica ISCIII)

En el estudio entomológico se identificaron cuatro especies de flebotomos: *P. perniciosus* (75.34 %), *P. sergenti* (0.005 %), *P. papatasi* (0.005 %) y *Sergentomyia minuta* (24.65 %). *P. perniciosus* se encontró en una densidad muy elevada, 193.6 por m².

Las capturas con trampas de luz mostraron una clara predominancia de *P. perniciosus*, observándose un pico máximo en agosto en 2012 mientras que en 2013 y 2014 el pico máximo tuvo lugar en septiembre^{10,21}.



Figura 6. A) Trampa de luz (CDC); B) Trampa adhesiva (Fuente: Laboratorio de Entomología Médica ISCIII).

4.3.2. Xenodiagnóstico

El Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII ha desarrollado un procedimiento específico para detectar el parásito en sangre periférica, por medio de xenodiagnóstico². Se trata de una metodología que permite probar la presencia, en este caso de *Leishmania*, en un vertebrado utilizando para tal fin el vector de la enfermedad, en este caso las hembras de flebotomos²⁰. La técnica consistió en colocar liebres o conejos procedentes del foco, previamente anestesiados en jaulas en las que se liberaron hembras de flebotomos procedentes de una colonia mantenida en el laboratorio. Todas las hembras que se alimentan durante el período de exposición son separadas para realizar la disección a los 4-5 días y comprobar la presencia o ausencia de *Leishmania* en el tubo digestivo^{15,16,20}.

Los resultados de las disecciones de los flebotomos demostraron que después de ingerir sangre de estos lepóridos, los flebotomos era eficientemente colonizados por *L. infantum*, revelando así no solo la presencia del parásito, sino también la transmisión del parásito.

4.3.3. Técnicas moleculares aplicadas en el estudio del brote

4.3.3.1. Detección de *Leishmania* spp. en *P. perniciosus*

La detección de *Leishmania* spp. mediante PCR convencional a partir del ADN obtenido de hembras de flebotomos capturadas en la zona del brote así como el estudio de las tasas de infección mediante las disecciones realizadas a las hembras de *P. perniciosus* capturadas vivas mediante trampas CDC han arrojado altas tasas de infección de las mismas por *L. infantum*^{10,21} pero el empleo de estas técnicas no ha permitido determinar la carga parasitaria. Para ello, el Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII desarrolló un método de detección de *Leishmania* por PCR a tiempo real (qPCR) permitiendo así determinar la carga parasitaria en los flebotomos infectados¹⁸.

El estudio de la carga parasitaria por qPCR determinó que el 70% de las hembras de flebotomos analizadas presentaron una alta carga de *L. infantum* en sus tubos digestivos. El 16,17% de ellos contenían más de 10000 parásitos, detectándose uno con una carga extraordinaria de más de 100.000¹⁹.

Tabla 1. Cargas parasitarias estimadas en flebotomos alimentados y no alimentados capturados en cada período de transmisión en el Brote de Fuenlabrada determinadas por el empleo de qPCR¹⁹.

Parásitos/ reacción	Flebotomos alimentados			Flebotomos no alimentados		
	2012	2013	2014	2012	2013	2014
>100.000	1	0	0	0	0	0
10.000>100.000	0	0	0	6	2	2
1000>10.000	3	2	0	4	5	2
100>1000	5	1	0	3	0	3
10>100	2	2	1	1	1	2
1>10	3	2	2	0	1	0
0,1>1	7	1	1	0	0	1
0,01>0,1	2	0	0	0	0	0
Total	23	8	4	14	9	10

4.3.3.2. Estudio del origen de la sangre ingerida por los flebotomos

El conocimiento de los posibles reservorios implicados en el área afectada es esencial para decidir qué medidas de control hay que llevar a cabo. En este sentido, el estudio de la sangre ingerida por el vector juega un papel muy importante. Inicialmente se comenzó empleando técnicas serológicas como ELISA, aunque estos métodos fueron reemplazados por herramientas moleculares, las cuales presentan una mayor precisión¹⁹.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la consecuente secuenciación, es ampliamente utilizada para el estudio de las preferencias alimentarias de los flebotomos. Así, dianas como el citocromo b (*cyt b*), la citocromo oxidasa I (COI) y la prepronociceptina (PNOC) han sido usados para dicho fin. Por otro lado, otras técnicas como PCR-RFLP (o PCR-reverse-line-blotting (RLB) también han sido empleadas en el estudio de la procedencia de la sangre ingerida^{17,19}.

Para el estudio de las preferencias alimentarias de *P. perniciosus*, el Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII ha desarrollado una PCR basada en la amplificación de un fragmento del *cyt b* y posterior secuenciación. En total fueron analizados 912 hembras de *P. perniciosus* capturadas entre 2012 y 2014, de las cuales 308 eran portadoras del parásito¹¹. Se identificaron los siguientes fuentes de alimentación: conejo (50,32%), liebre (19,15%), gato (3,57%), humano (0,97%) y perro (0,32%)^{10,17,21}.

Los porcentajes de hembras alimentadas de sangre procedente de conejos aumentaron durante el estudio, el 41% en 2012, el 50,54% en 2013 y el 58,62% en 2014. Por el contrario, la tasa de liebres como fuente de sangre disminuyó, 28%, 17,58% y 12,93 % en 2012, 2013 y 2014, respectivamente¹⁰.

4.3.3.3. Caracterización de los aislados de *Leishmania*

Para determinar la virulencia del parásito detectado en el brote, el Laboratorio de Entomología del ISCIII ha realizado estudios de infección *ex vivo* e *in vivo* usando modelos de experimentación animal. Los resultados obtenidos en cuestión indican que los aislados de *Leishmania* (BOS1FL1 y POL2FL7) obtenidos de hembras de flebotomos infectadas capturadas en la zona del brote presentan un fenotipo muy virulento en términos de índice de infección, producción de citoquinas y actividades enzimáticas implicadas en la patogénesis de leishmaniasis de tipo visceral. Todo esto, podría ser la razón por la cual se explica la inusual capacidad parasitaria de infectar personas inmunocompetentes. En este aspecto todavía debe

profundizarse más²³. Además los aislados de *Leishmania* obtenidos de casos humanos así como los de flebotomos, liebres y conejos han sido caracterizados perteneciendo al mismo genotipo de *Leishmania infantum*

5. CONCLUSIONES

- El trabajo activo y conjunto de las Autoridades Sanitarias y de los Laboratorios de Entomología Médica por un lado y de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas del ISCIII están permitiendo disminuir el número de casos de leishmaniosis en la zona permitiendo orientar de manera específica las medidas de prevención y control.
- Los estudios de xenodiagnóstico realizados por el Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII a lo largo del brote han demostrado la participación activa de las liebres y los conejos en la zona como reservorios principales implicados en la transmisión del parásito y han puesto de manifiesto un solapamiento de los ciclos de transmisión selvático y peridoméstico. Este hallazgo ha supuesto un hito en la transmisión de la leishmaniosis ya que hasta ahora se consideraba al perro como casi único reservorio de la leishmaniosis en la Comunidad de Madrid.
- El grupo de científicos pertenecientes al Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII han desarrollado diversos protocolos moleculares para detectar *Leishmania* y determinar la carga parasitaria en los flebotomos capturados en la zona. Así mismo ha estudiado las preferencias alimentarias, la actividad infectiva del parásito, la gran virulencia del mismo, lo cual ha permitido explicar la capacidad parasitaria de infectar sujetos inmunocompetentes.
- Para erradicar el brote deben continuarse los estudios de la vigilancia y control del vector, así como de los reservorios implicados e incidiendo en la información y educación sanitaria de la población.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Leishmaniasis en la Comunidad de Madrid. Documentos Técnicos de Salud Pública Dirección General de Salud Pública. Septiembre 2015. Disponible en: <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017837.pdf>
- 2- Carrión, FJ. Leishmaniosis, la enfermedad en humanos: epidemiología, antecedentes y situación actual. 2017. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/313182487>
- 3- Resolución de 22 de diciembre de 1981, de la Dirección General de Salud Pública, por la que se modifica la lista de enfermedades de declaración obligatoria. (B.O.E. 15 de enero de 1982)
- 4- Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Octubre 2012. Disponible en: <https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf>
- 5- Pérez F, Montilla M, Muñoz F. 2016. Brote de Leishmaniasis en la Comunidad Autónoma de Madrid. Importancia de las medidas de prevención. Enfermería Global. 15 (1) Disponible en: <http://revistas.um.es/eglobal/article/view/237221/188611>.
- 6- Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolos de enfermedades de declaración obligatoria. Madrid, 2013. Protocolo de vigilancia de leishmaniasis [405-415]. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/PROTOCOLOS_RENAVE.pdf
- 7- Noguerol Álvarez M, Aparicio Azcarra P. A propósito de un caso: Leishmaniasis. 2012. Revista AMF (Actualización en Medicina de Familia). 8 (9): 509-516 Sociedad Española de Medicina y Comunitaria. Disponible en: http://amf-semfyc.com/web/article_ver.php?id=1064
- 8- Aguado M, Espinosa A, Romero-Matía A., Tardío J.C, Córdoba S y Borbujo J. 2013. Brote de leishmaniasis cutánea en el municipio de Fuenlabrada.

Actas Dermosifiliográficas 104(4):334-342

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2012.11.005>

- 9- Suárez B, Isidoro B, Santos S, Sierra MJ, Molina R, Astray J y Amela C. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Rev Esp Salud Pública; 2012. Vol. 86 nº 6.:555-564. Disponible en: http://scielo.isciii.es/pdf/resp/v86n6/02_colaboracion_especial1.pdf
- 10- González E, Jiménez M, Hernández S, Martín-Martín I, Molina R. 2017. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis of Madrid Spain (2012 - 2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. Parasites and Vectors (en prensa).
- 11- Informe Brote comunitario de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid, 2009 – 2012. Dirección general de atención primaria. Servicio de Epidemiología. Servicio Madrileño de Salud. Disponible en: <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadertype=Content-disposition&blobheadertype=cadena&blobheadertype=filename%3DBrote+Leishmaniasis+2009-12.pdf&blobheadertype=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1310973741904&ssbinary=true>
- 12- Aránguez E, Arce A, Moratilla L, Estirado A, Iriso A, De la Fuente S, Soto MJ, Fuster F, Ordobás M, Martínez AM, Vilas F. 2014. Análisis espacial de un brote de leishmaniasis en el sur del Área metropolitana de la Comunidad de Madrid. 2009-2013. Revista de Salud Ambiental 14(1):39-53.
- 13- Carrión, FJ. La importancia de la leishmaniosis en España (2015). Disponible en: <http://www.madridmasd.org/informacionidi/analisis/analisis/analisis.asp?id=62559>
- 14- 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. 2012. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental. Profesión Veterinaria 17:6-15.

- 15- Jimenez 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?. *Veterinary Parasitology* 202: 296-300. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027>
- 16- 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. *Veterinary Parasitology* 190:268- 271. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>
- 17- 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. 2013. *Parasitology Research* 112: 2453-2459. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/236087348_Detection_of_Leishmania_infantum_and_identification_of_blood_meals_in_Phlebotomus_perniciosus_from_a_focus_of_human_leishmaniasis_in_Madrid_Spain
- 18- 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. 2017. *Acta Tropica* 171: 68-73. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.023>
- 19- González E, Gállego M, Molina R, Abras A, Alcover MM, Ballart C, Fernández A, Jiménez M. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome *b* gene. 2015. *Acta Tropica* 152: 96-102 disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020>
- 20- Molina R, González E, Martín-Martín I, Hernández S y Jiménez M. 2017. Xenodiagnóstico de la leishmaniosis: Implicación de los lepóridos en el ciclo selvático de *Leishmania infantum* en Bosque Sur. En: Brote de Leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios. 2017. Comunidad de Madrid 2017. Edita: Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid (Mayo 2017). ISBN: 978-84-451-3625-6 Depósito Legal: M-13775-2017.

- 21- Jiménez M, González E, Hernández S, Martín-Martín I, Molina R. 2017. Dinámica estacional, preferencias alimentarias y niveles de infección por *Leishmania infantum* en *Phlebotomus perniciosus* capturados en Bosque Sur (2012-2013). En: Brote de Leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios. 2017. Comunidad de Madrid 2017. Edita: Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid (Mayo 2017). ISBN: 978-84-451-3625-6 Depósito Legal: M-13775-2017.
- 22- Iriso A, Tello, A, González-Mora D, Vázquez MA, Molina R, Jiménez M, Lucientes J. 2017. Control del vector. En: Brote de Leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios. 2017. Comunidad de Madrid 2017. Edita: Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid (Mayo 2017). ISBN: 978-84-451-3625-6 Depósito Legal: M-13775-2017.
- 23- Domínguez-Bernal G, Jiménez M, Molina R, Ordóñez-Gutiérrez L, Martínez-Rodrigo A, Mas A, Cutuli MT y Carrión J. 2014. Characterisation of the *ex vivo* virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from an outbreak of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasites & Vectors* 7:499
Disponible en:
<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-014-0499-1>
- 24- Noguerol Álvarez M, San Martín López JV, Aguado Lobo M y Aparicio Azcárraga M. 2012. Brote comunitario de leishmaniasis en la zona sur de la Comunidad de Madrid. *Atención Primaria*, 8:508-509