



TESIS DOCTORAL

*Impacto de un brote de leishmaniasis en
población inmunosuprimida no VIH*

Autora:

Belén Matía Hernando

Director:

Juan Víctor San Martín López

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de Doctorado

2019

Esta tesis está dedicada a la memoria de mi abuelo Luis, que siempre insistió en la importancia de la triple faceta del médico.

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de muchos compañeros del Hospital Universitario de Fuenlabrada: Luis, Elena, Chema y el resto de adjuntos y resis de Medicina Interna, Paloma, Ana Ontañón y el Servicio de Farmacia, Marta Aguado, Alberto Romero-Maté y el Servicio de Dermatología, los servicios de Digestivo, Reumatología, Salud Pública, Análisis Clínicos (en especial Jesús y Laura); y del Instituto de Salud Carlos III (en especial Eugenia y Javier). Alicia y María han marcado y acompañado este y otros caminos, han hecho guardia localizada de WhatsApp para dudas urgentes, y han sido (desde Nava 2010) más que mis compañeras, mis hermanas.

Tampoco habría llegado hasta aquí sin el apoyo constante en forma de raíces, de alas y de tribu de mis padres Paloma y Nacho y mi hermana Palo.

Ni esto ni tantas otras cosas serían posibles sin Enrique que nos cuida a todos y trabaja por nuestra familia cada día sin un mal gesto ni un momento de flaqueza, y hace todo fácil, bonito y divertido.

A todos, GRACIAS.

A Juan Víctor: la paciencia y la generosidad, el ánimo inquebrantable, la alegría, el trabajo bien hecho... gracias por todo y sobre todo por el ejemplo.

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	5
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 Leishmaniasis: Generalidades	7
1.1.1 Introducción, vector y reservorio	7
1.1.2 Ciclo	7
1.1.3 Clasificación	8
1.1.4 Epidemiología	9
1.2 Leishmaniasis en nuestro medio	11
1.2.1 Epidemiología	11
1.2.2 Formas clínicas	14
1.2.3 Diagnóstico	15
1.2.4 Tratamiento	18
1.3 Brote de Fuenlabrada	20
1.4 Inmunidad frente a <i>Leishmania</i>	24
1.5 Papel del TNF en la infección por <i>Leishmania</i>	27
1.6 Leishmaniasis en pacientes inmunosuprimidos	30
1.7 Fármacos anti-TNF	31
1.7.1 Riesgo de infecciones	34
1.7.2 Riesgo de enfermedades granulomatosas	37
1.8 Detección de infección latente. Marcadores de curación y recidiva	42
2 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	47
3 MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1 Ámbito del estudio, diseño y muestras	49
3.1.1 Objetivos 1, 2 y 4	49
3.1.2 Objetivo 3	50
3.1.3 Objetivos 1 y 5	50
3.2 Definiciones	52
3.3 Métodos	53
3.3.1 Objetivo 1	53
3.3.2 Objetivo 2	54
3.3.3 Objetivo 3	54

3.3.4	Objetivo 4	54
3.3.5	Objetivo 5	55
3.4	Técnicas de laboratorio (Instituto de salud Carlos III).....	56
3.4.1	Cultivos en medio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle).....	56
3.4.2	Aislamiento de ADN genómico y PCR en tiempo real	56
3.4.3	Estudio de la respuesta inmune	57
3.4.3.1	Determinación de la respuesta inmune humoral.....	57
3.4.3.2	Determinación de la respuesta inmune celular.....	59
3.5	Análisis estadístico	61
3.6	Financiación.....	61
3.7	Conflictos de interés.....	61
3.8	Consentimiento informado	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Objetivo 1	63
4.2	Objetivo 2	64
4.3	Objetivo 3	65
4.3.1	Leishmaniasis visceral	71
4.3.2	Leishmaniasis cutánea.....	77
4.3.3	Leishmaniasis mucosa	79
4.4	Objetivo 4	80
4.5	Objetivo 5	84
4.5.1	Resultados en los pacientes enfermos.....	84
4.5.1.1	Leishmaniasis visceral	84
4.5.1.2	Leishmaniasis cutánea	87
4.5.1.3	Leishmaniasis mucosa	88
4.5.1.4	Posibles marcadores de curación en pacientes inmunosuprimidos	89
4.5.2	Resultados en la muestra de pacientes asintomáticos	89
5	DISCUSIÓN.....	95
5.1	Prevalencia de infección asintomática en pacientes en tratamiento anti-TNF	95
5.2	Incidencia de enfermedad en pacientes en tratamiento anti-TNF	98
5.3	Características de los casos de leishmaniasis en pacientes inmunosuprimidos... ..	100
5.4	Factores de riesgo de exposición a <i>Leishmania</i>	105
5.5	Factores de riesgo de enfermedad	106
5.6	Marcadores de curación y recidiva	112

5.7	Infección asintomática	114
5.8	Limitaciones del estudio.....	117
6	CONCLUSIONES	121
7	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	123
7.1	Publicaciones en revistas internacionales.....	123
7.2	Comunicaciones a congresos internacionales.....	123
8	BIBLIOGRAFÍA.....	125
	ANEXO I: Consentimiento informado	141
	ANEXO II: Características de la muestra de 102 pacientes asintomáticos	147

GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

ABL:	Anfotericina B liposomal
APs:	Artritis psoriásica
AR:	Artritis reumatoide
CE:	Corticoesteroides
CI:	Confidence interval (Intervalo de confianza)
CK:	Citoquinas
CMBD:	Conjunto mínimo básico de datos
CPA-SLA:	Cellular Proliferation Assay to Soluble <i>Leishmania</i> Antigen (respuesta celular linfoproliferativa tras estimulación con Antígeno Soluble de <i>Leishmania</i>)
DMARDS:	Disease-modifying antirheumatic drugs (fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad)
DS:	Desviación estándar
EA:	Espondilitis anquilosante
EDO:	Enfermedad de declaración obligatoria
EII:	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EPOC:	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FDA:	Food and Drug Administration
HUF:	Hospital Universitario de Fuenlabrada
IFI = IFAT:	Indirect fluorescent antibody test (inmunofluorescencia indirecta)
IgG:	Inmunoglobulina G
IL:	Interleuquina
im:	Intramuscular

INF-gamma: Interferón gamma

IS: Inmunosupresores

ISCI: Instituto de Salud Carlos III

iv: intravenoso/a

LC: Leishmaniasis cutánea

LM: Leishmaniasis mucosa

LMC: Leishmaniasis mucocutánea

LV: Leishmaniasis visceral

MO: médula ósea

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds ratio (razón de probabilidades)

PCR: Proteína C reactiva

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Ps: Psoriasis

qPCR: PCR cuantitativa = PCR en tiempo real

RIQ: Rango intercuartílico

SLA: Soluble *Leishmania* antigen (antígeno soluble de *Leishmania*)

TB: Tuberculosis

TNF: Tumor necrosis factor (factor de necrosis tumoral)

TOS: Trasplante de órgano sólido

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

vs.: versus

WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud, OMS)

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis: Generalidades

1.1.1 Introducción, vector y reservorio

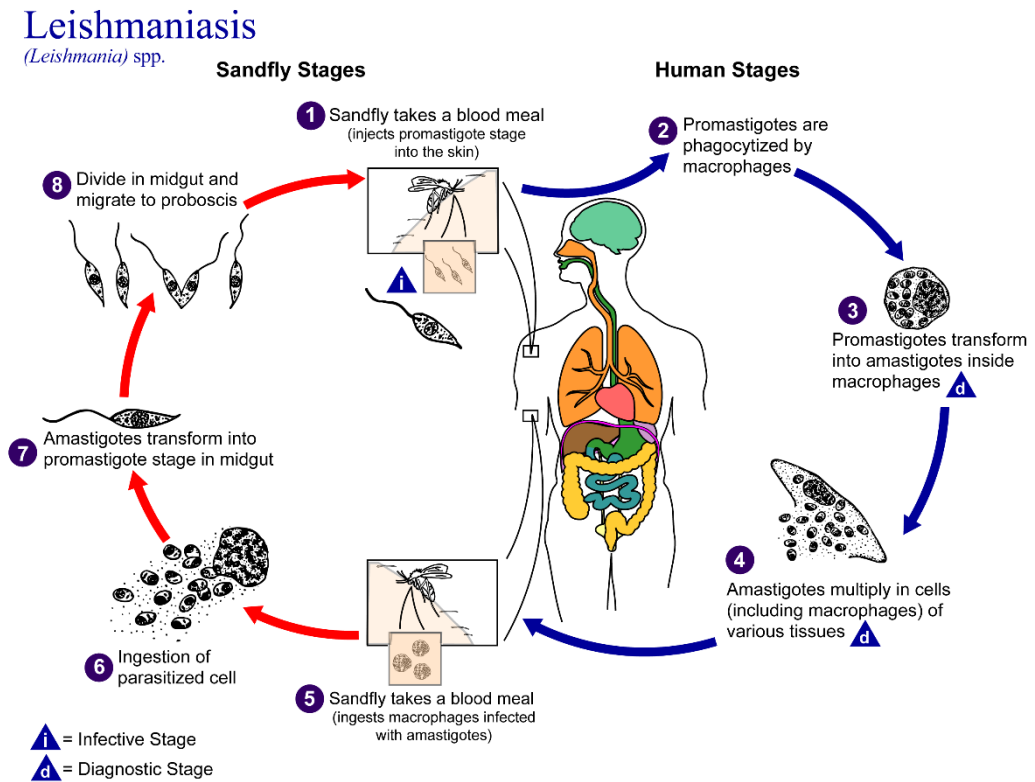
La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por algunas especies patógenas del protozoo *Leishmania*, distribuidas por diversas regiones del mundo. El término leishmaniasis abarca un espectro de síndromes clínicos, dependiendo de la especie de *Leishmania* implicada y de diversos factores del parásito y del huésped.

Se trata de una zoonosis que afecta a mamíferos salvajes o domésticos (perros y roedores fundamentalmente), y su vía principal de transmisión es la picadura de las hembras de mosquitos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya*. En zonas de endemia, la transmisión puede ser también antroponótica siendo el humano el reservorio. Existen casos descritos de transmisión vertical, sexual, y por transfusión sanguínea (1–3). También se ha demostrado en España la transmisión por el uso compartido de jeringas contaminadas en usuarios de drogas por vía parenteral (4).

1.1.2 Ciclo

Leishmania spp. es un protozoo diploide con un ciclo vital dimórfico (Figura 1). El mosquito tras su picadura ingiere macrófagos infectados con amastigotes, que en el intestino se transforman en promastigotes (forma flagelada), migran a la probóscide y son inoculados al huésped durante la picadura. Son fagocitados por los macrófagos de la dermis y se transforman en éstos en amastigotes, multiplicándose luego en las células del sistema retículoendotelial de varios tejidos. La patogenia de la enfermedad se explica en detalle más adelante.

Figura 1: Ciclo vital de *Leishmania* spp.



Extraído de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (Consultado 1/2/2017)

1.1.3 Clasificación

La clasificación taxonómica de las subespecies de *Leishmania* puede ser algo confusa y está en constante evolución. Inicialmente basada en gran parte en datos clínicos y epidemiológicos, ha ido cambiando en las últimas décadas con la introducción de nuevas técnicas de tipificación, y puede diferir además según las zonas geográficas por los distintos métodos utilizados en los laboratorios de referencia. En la Figura 2 se muestra una tabla con los principales síndromes clínicos, las subespecies causantes de éstos y su distribución geográfica.

Figura 2: Especies de *Leishmania*, síndromes clínicos principales y distribución geográfica.

TABLE 277-1 <i>Leishmania</i> Parasites, Major Clinical Syndromes, and Distribution		
CLINICAL SYNDROMES	LEISHMANIA SPP.	LOCATION
Visceral leishmaniasis (VL) (also known as kala-azar): generalized involvement of the reticuloendothelial system (spleen, bone marrow, liver, lymph nodes)	<i>Leishmania donovani</i> causes classic VL in Asia	Major endemic/epidemic focus in Indian subcontinent (lowland Terai region of southern Nepal, Bangladesh, Bihar province, and surrounding areas in India) Endemic/sporadic in China, Pakistan, Indian subcontinent
	<i>Leishmania infantum</i> causes infantile VL in the Old World. <i>Leishmania chagasi</i> / <i>L. infantum</i> causes VL in the Americas	Middle East, Mediterranean littoral, Balkans, Central and southwestern Asia, northern and western China, North and sub-Saharan Africa, Latin America
	<i>Leishmania donovani</i> / <i>L. infantum</i>	East Africa: Ethiopia, Kenya, Somalia, Sudan, Uganda
	<i>Leishmania amazonensis</i> is uncommon cause of atypical VL in the Americas	Brazil (Bahia state)
	<i>Leishmania tropica</i> is rarely associated with VL syndrome, often atypical	Middle East, Saudi Arabia (U.S. troops), India, North Africa, Pakistan, Mediterranean littoral, Central and western Asia
Post-kala-azar dermal leishmaniasis	<i>L. donovani</i> <i>L. donovani</i> / <i>L. infantum</i>	Indian subcontinent East Africa: Ethiopia, Kenya, Somalia, Sudan, Uganda
Old World cutaneous leishmaniasis: single or limited number of skin lesions	<i>Leishmania major</i> (also known as moist or rural oriental sore)	Middle East, India, Pakistan, Africa, Central and western Asia, northern and western China
	<i>Leishmania tropica</i> (also known as dry or urban oriental sore)	Mediterranean littoral, Middle East, North Africa, India, Pakistan, Central and western Asia
	<i>Leishmania aethiopica</i>	Ethiopian highlands, Kenya, Yemen
	<i>L. infantum</i> / <i>L. chagasi</i> (rare)	Middle East, Mediterranean littoral, Central Asia, northern and western China, North and sub-Saharan Africa
	<i>L. donovani</i> / <i>L. infantum</i>	East Africa: Ethiopia, Kenya, Somalia, Sudan, Uganda
New World cutaneous leishmaniasis: single or limited number of skin lesions	<i>Leishmania mexicana</i> (chiclero's ulcer)	Central and South America, Texas
	<i>L. amazonensis</i>	Amazon Basin, neighboring areas, Bahia and other states of Brazil
	<i>Leishmania pifanoi</i>	Venezuela
	<i>Leishmania garnhami</i>	Venezuela
	<i>Leishmania venezuelensis</i>	Venezuela
	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Central and South America
	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> (forest yaws or pian bois)	Guyana, Surinam, northern Amazon Basin
	<i>Leishmania (V.) peruviana</i> (uta)	Peru (western Andes)
	<i>Leishmania (V.) panamensis</i>	Panama, Costa Rica, Colombia
	<i>Leishmania (V.) colombiense</i>	Colombia and Panama
	<i>L. infantum</i> / <i>L. chagasi</i>	Central and South America
Leishmaniasis recidivans	<i>L. tropica</i>	North Africa, Afghanistan, and Middle East
Diffuse cutaneous leishmaniasis	<i>L. amazonensis</i>	Amazon Basin, neighboring areas, Bahia and other states of Brazil
	<i>L. pifanoi</i>	Venezuela
	<i>L. mexicana</i>	Central and South America, Texas
	<i>Leishmania</i> spp.	Dominican Republic
	<i>L. aethiopica</i>	Ethiopian highlands, Kenya, Yemen
Disseminated leishmaniasis	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) amazonensis</i>	Brazil
American mucosal leishmaniasis	<i>L. (V.) braziliensis</i> (espundia)	Central and South America; most cases from Bolivia, Brazil, and Peru
	Other <i>Leishmania (V.)</i> spp. (<i>guyanensis</i> , <i>panamensis</i>) are rare	Central and South America

Extraído de Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Vol 2, Eighth Ed. Alan J. Magill. *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis, copyright © (2015) by Saunders, an imprint of Elsevier, con autorización de Elsevier.

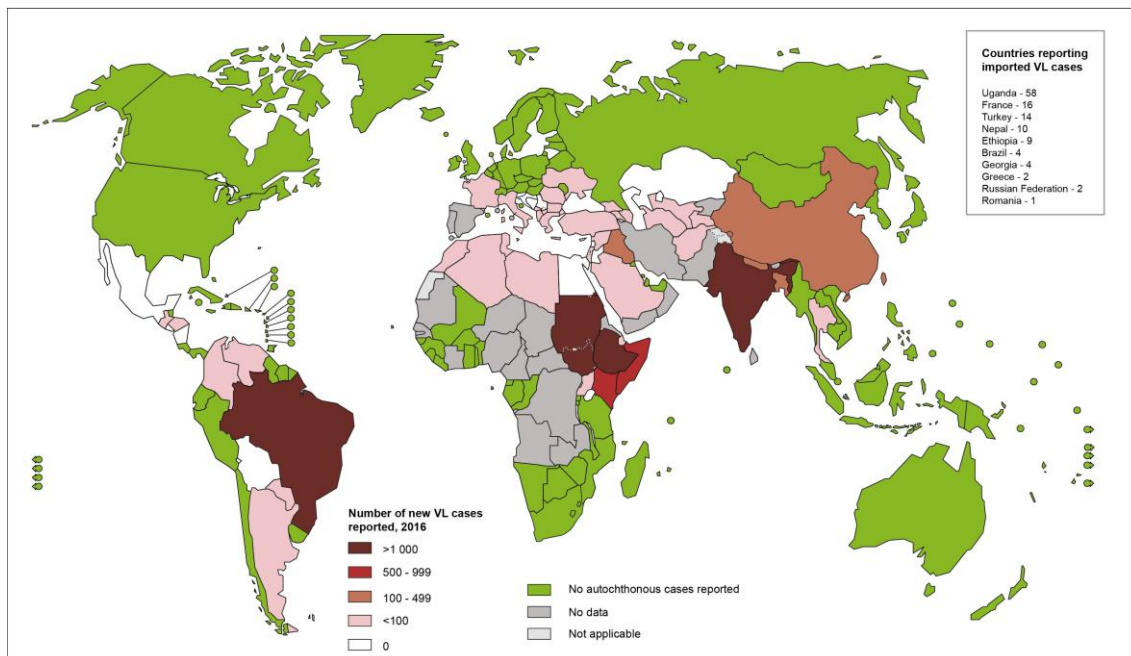
1.1.4 Epidemiología

La leishmaniasis es endémica en 98 países en regiones tropicales, subtropicales y templadas, distribuyéndose en éstos de forma heterogénea (así, por ejemplo, en 2017 el 94% de los casos de leishmaniasis visceral (LV) se notificaron en siete países: Brasil, Etiopía, India, Kenia, Somalia, Sudán y Sudán del Sur). En la Figura 3 se muestra la distribución mundial según los datos de 2016 (forma visceral) y en la Figura 4 los datos de la forma cutánea.

Se estima que en el mundo 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, y ocurren aproximadamente 1.3 millones de casos nuevos cada año (de estos, un millón son formas cutáneas) (5). Cursa además con brotes epidémicos relacionados con situaciones de desnutrición, guerras o cambios medioambientales.

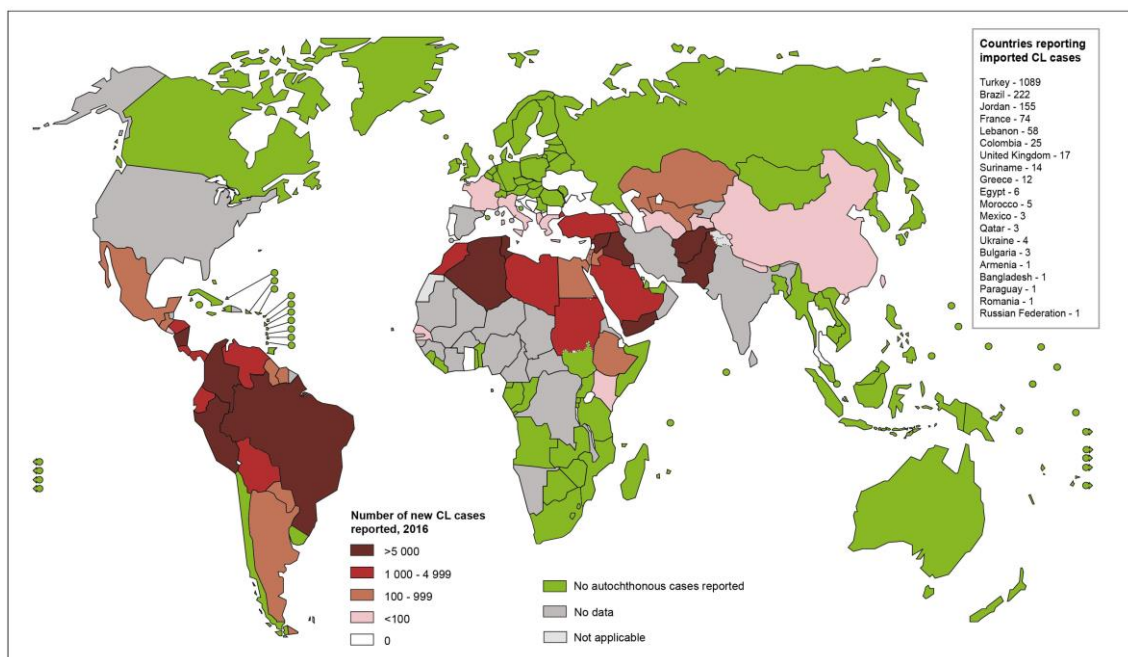
Se considera que está infradeclarada como muchas otras enfermedades tropicales (existen limitados medios de diagnóstico, pocos sistemas de notificación, posibilidad de confundirla con otras enfermedades muy frecuentes...), y forma parte del grupo de las Enfermedades Olvidadas (Neglected Tropical Diseases, NTD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS): enfermedades infecciosas que afectan a 1000 millones de personas en el mundo y que ocurren fundamentalmente en países empobrecidos, por lo que reciben escasa atención mediática y pocos recursos.

Figura 3: Estado de endemidad de la leishmaniasis visceral a nivel mundial, 2016



Extraído de <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (consultado 13/12/2018)

Figura 4: Estado de endemicidad de la leishmaniasis cutánea a nivel mundial, 2016.



Extraído de <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (consultado 13/12/2018)

La LV ha resurgido además en las últimas décadas en Europa como enfermedad oportunista en pacientes VIH, trasplantados o con otras alteraciones de la inmunidad celular.

1.2 Leishmaniasis en nuestro medio

1.2.1 Epidemiología

Menos del 2% de la carga de enfermedad de leishmaniasis en el mundo se da en la región europea, si bien la OMS considera que en la mayoría de estos países se encuentra infraestimada o directamente indeterminada (6). Afecta fundamentalmente a la cuenca del Mediterráneo (Figura 5). España es uno de los países con mayor incidencia de LV (suma junto con Italia, Albania y Georgia el 75% de los casos), mientras que la LC se da mayoritariamente en países del este de la región como Israel y Turquía.

En nuestro país un tercio de los casos suceden en niños menores de 9 años, y otro tercio en adultos con infección por el VIH (10).

Hay que tener en cuenta que la prevalencia real en España no es conocida, dado que no existe un programa de control nacional, y solo se considera Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en 12 de 17 comunidades autónomas. Varias revisiones retrospectivas (10,11) han puesto además en duda la capacidad de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) para detectar todos los casos de enfermedad: Utilizando el CMBD (Conjunto Mínimo Básico de Datos, base de datos del Ministerio de Sanidad que incluye los diagnósticos codificados de todos los ingresos hospitalarios a nivel nacional) se evidenciaron aproximadamente el doble de ingresos por leishmaniasis visceral del número de casos declarados en el mismo periodo. Se dieron además casos en todas las Comunidades, incluyendo aquellas donde la enfermedad no se considera endémica y por tanto no es EDO. La inmensa mayoría de los casos de leishmaniasis cutánea no se declara (5).

Las especies de flebotomo implicadas en la transmisión de la enfermedad en España son *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*. El primero se distribuye por toda la Península (salvo las comunidades cantábricas) y el archipiélago balear, y el segundo se distribuye por el sur de Galicia y Castilla y León, el cuadrante nordeste peninsular (incluyendo la Comunidad de Madrid), el litoral mediterráneo, Mallorca, el norte de Andalucía y la provincia de Badajoz (10).

El período de actividad de este insecto en el área Mediterránea abarca aproximadamente desde mayo a octubre. Los huevos y larvas se desarrollan en microhábitat húmedos ricos en materia orgánica, no en el agua. Su actividad es predominantemente nocturna. No son capaces de volar distancias largas: vuelan a 1m/s (mucho menos que otros mosquitos) y no pueden volar con viento mayor de esta velocidad, por lo que tienden a

permanecer a poca distancia del suelo y cerca de sus criaderos (se calcula un radio de dispersión de 2km máximo) (8). Únicamente las hembras tienen un aparato bucal suficientemente desarrollado para perforar la piel (necesitan sangre para desarrollar los huevos) y por tanto ser infectivas.

1.2.2 Formas clínicas

Existen dos grandes formas clínicas de presentación en nuestro medio: la leishmaniasis cutánea y la leishmaniasis visceral.

La leishmaniasis cutánea (LC) se manifiesta habitualmente como lesiones maculopapulosas únicas o múltiples, con una zona central costrosa, que aparecen en la zona de la picadura del insecto, y que frecuentemente se resuelven de forma espontánea tras meses de evolución.

La leishmaniasis visceral (LV) suele manifestarse tras un período de incubación de entre 10 días y dos años, siendo lo más habitual entre 2 y 8 meses. Se presenta típicamente de forma subaguda con un cuadro de fiebre acompañada de malestar general, pérdida de peso y dolor en el hipocondrio izquierdo. Es frecuente el hallazgo de esplenomegalia y las alteraciones analíticas típicas son pancitopenia, hipergammaglobulinemia con hipoalbuminemia y elevación de reactantes de fase aguda.

Sin tratamiento la leishmaniasis visceral es habitualmente una enfermedad mortal. La muerte suele deberse a sobreinfecciones (neumonía, sepsis, tuberculosis) o complicaciones debidas a la anemia, malnutrición o hemorragias.

Existen también formas mucosas o mucocutáneas (LM, LMC), que afectan generalmente a la cavidad nasal, oral, faringe o laringe. Estas son poco frecuentes en nuestro medio y han sido descritas fundamentalmente en América, causadas por *L. braziliensis*,

panamensis, *guyanensis* o *amazonensis*. Puede tratarse de lesiones ulcerativas o hipertróficas y causan importante desfiguración y alteración funcional.

Los casos descritos por *L. infantum* (12) presentan algunas diferencias con el cuadro típico de LM de América: La afectación nasal es poco frecuente al contrario que en aquella, se trata en general de lesiones mucho menos agresivas y en las biopsias se encuentra gran cantidad de parásitos mientras que en las formas americanas suelen ser escasos. Aproximadamente la mitad de los casos descritos se han dado en población inmunodeprimida. La mayoría son formas mucosas aisladas, aunque existe también algún caso descrito de afectación mucocutánea (13,14).

Los motivos por los que se desarrolla una u otra forma de enfermedad dependen en gran medida de la respuesta inmune que sea capaz de desarrollar el huésped, y de factores genéticos, nutricionales, ambientales y otros no bien conocidos. Comentaremos con detenimiento más adelante lo que se conoce sobre la patogenia de la enfermedad y sus implicaciones en pacientes con alteraciones de la inmunidad.

1.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico definitivo de enfermedad requiere la demostración del parásito en sangre o tejido, generalmente mediante punción-aspiración o biopsia del tejido u órgano afecto, por métodos parasitológicos (**visualización directa, cultivo**) o moleculares (Reacción en cadena de la polimerasa, **PCR**).

En la LV la sensibilidad de la visualización directa es máxima en aspirado esplénico, pero es una técnica que se complica en el 0.1% de los casos con hemorragias de riesgo vital (8), por lo que en nuestro medio se realiza de forma habitual la biopsia de médula ósea,

mucho más segura que la biopsia esplénica o hepática, aunque de sensibilidad menor (53-86% (15), algo mayor en pacientes VIH).

Para el diagnóstico de LV existen métodos indirectos que detectan antígenos o anticuerpos, y que por su mayor disponibilidad y rapidez permiten un diagnóstico probable en pacientes con alta sospecha clínica. Estos son (16):

- **Test de aglutinación directa (DAT, Direct agglutination test)**
- **Test rápido de aglutinación (FAST)**
- **Test de aglutinación de látex en orina (KAtex)**
- **Inmunofluorescencia indirecta (IFAT, Indirect fluorescent antibody test)**
- **Hemaglutinación indirecta (IHA)**
- **ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas):** Utiliza diferentes antígenos. Uno de los más utilizados es el **CSA** (crude soluble antigen). En las últimas décadas se han utilizado antígenos recombinantes como el **rk** o **rKLO8**
- **Tira inmunocromatográfica basada en rk 39.**

Los métodos más precisos parecen ser el ELISA basado en rk39, la tira rápida rk39 y el DAT, sobre todo estos dos últimos (17,18), aunque la sensibilidad y especificidad varían de forma importante según el país estudiado.

Los anticuerpos siguen siendo positivos meses o años tras la curación, por lo que estos métodos no sirven para detectar recaídas ni para diferenciar enfermedad de infección asintomática. Además, pueden dar falsos negativos en pacientes inmunodeprimidos que no consiguen desarrollar una respuesta humoral. Los métodos basados en antígenos son en teoría más específicos que los de anticuerpos porque tienen menos reactividad cruzada y generalmente solo son positivos en infección activa (negativizan rápido tras tratamiento).

Durante los últimos años se han desarrollado variaciones de la técnica PCR como son la PCR anidada, semianidada y cuantitativa. Estas pueden realizarse en sangre o muestras de tejido (nódulos linfáticos, médula ósea, bazo, hígado), y también se han desarrollado técnicas en orina y en saliva. La PCR cuantitativa, al contrario que la estándar, permite diferenciar entre infección asintomática y enfermedad. Utiliza DNA del kinetoplasto, y se ha visto que los niveles circulantes de éste son 500 veces menores en pacientes asintomáticos que en pacientes con VL activa, por lo que puede ser utilizada como test para seguimiento de pacientes asintomáticos o curados (19).

Pese a que el valor predictivo positivo de la sospecha clínica en pacientes con un cuadro típico de LV es alto, frecuentemente los síntomas y signos son compatibles con otras enfermedades (paludismo, enfermedades linfoproliferativas...). La OMS recomienda no tratar a pacientes sin un diagnóstico de certeza (clínica compatible y un test serológico o parasitológico positivo). En cuanto al test a utilizar, no se considera que exista una única prueba de elección o *gold standard* para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral, y habitualmente se solicitan simultáneamente pruebas parasitológicas y serológicas, en ocasiones varias, para aumentar la probabilidad de diagnóstico.

Para la tipificación de especie y cepa se utilizan aún mayoritariamente los patrones de isoenzimas mediante MLEE (Electroforesis de enzimas multilocus), que las separa en grupos que comparten el mismo perfil (zimodemas), aunque se están desarrollando otras técnicas basadas en la PCR (amplificación y secuenciación de DNA, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, etc.).

1.2.4 Tratamiento

El tratamiento de elección (8) de la **LV** producida por *L. infantum* (grado de recomendación B) es anfotericina B liposómica iv 3-5 mg/kg/día hasta un total de 18-21 mg/kg repartidos en 3-7 dosis (normalmente los días 1-5, 14 y 21). La curación definitiva solo se establece si no existe recaída en 6 meses. No se recomienda realizar test parasitológicos de control en pacientes que respondan clínicamente.

En segunda línea (20) estarían los tratamientos con antimoniales pentavalentes (Estibogluconato de sodio o antimoniato de meglumina. Grado de recomendación B) o anfotericina B desoxicolato (grado de recomendación C), con mayor toxicidad y tasas de curación similares.

En pacientes VIH, la dosis recomendada es 3-4 mg/kg/día, con una dosis total de 30-40 mg/kg, en pauta de días 1-5, 10, 17, 24, 31, 38. En estos pacientes existe un alto riesgo de recaída por lo que en pacientes con menos de 200 linfocitos CD4 se recomienda profilaxis secundaria con una dosis mensual (21).

En otras inmunodepresiones no existe evidencia sobre la dosis óptima o la necesidad de profilaxis secundaria. Las últimas recomendaciones tanto de la OMS (22) como de la IDSA (Infectious Diseases Society of America) (23) son usar la misma dosis que para pacientes VIH y disminuir la dosis de inmunosupresores si es posible. No se recomienda profilaxis secundaria de forma rutinaria (lo dejan a criterio del médico) pero sí seguimiento estrecho y prolongado del paciente para detectar posibles recaídas. La OMS, no así la IDSA, recomienda cribado serológico antes de iniciar una inmunosupresión en pacientes que viven en zona endémica o vuelven de la misma.

Otros fármacos utilizados en zonas endémicas son paramomicina (im), miltefosina (oral) y pentamidina (im o iv). No existen estudios con estos fármacos en nuestro medio y la amplia disponibilidad y efectividad de la anfotericina B liposomal hace que no sean necesarios por el momento salvo en casos seleccionados de pacientes con múltiples recaídas.

En otros países como India, donde el tratamiento habitual ha sido durante años los antimoniales pentavalentes, se han empezado a desarrollar resistencias a los mismos, lo que ha llevado a la instauración de pautas de tratamiento combinado, que permiten además reducir la duración del tratamiento y por tanto la toxicidad de este, y mejorar la adherencia. Se han probado combinaciones de antimoniales y paramomicina, antimoniales y pentamidina, anfotericina B liposomal y miltefosina, etc. (20).

En los pacientes que sufren una recaída no existe evidencia para recomendar una actitud concreta. Pueden ser tratados con otro fármaco, el mismo fármaco a dosis más altas o un periodo de tiempo más prolongado, o una combinación de fármacos (22).

El tratamiento más utilizado para la LC en nuestro país es la inyección intralesional de antimoniato de meglumina (24). También puede utilizarse terapia fotodinámica, termoterapia, crioterapia, combinaciones de antimoniales intralesionales con crioterapia o pomadas de paramomicina. Dado que muchas lesiones se resuelven de forma espontánea, en algunos casos leves en zonas en las que no exista riesgo de cicatrices desfigurantes o discapacitantes puede ser una actitud adecuada la observación.

En casos de lesiones múltiples o grandes (>4cm) o en zonas delicadas, inmunosupresión o fracaso del tratamiento tópico se recomienda tratamiento sistémico como en la LV (22). Existe en cualquier caso poca evidencia disponible sobre terapia para LC debida a *L. infantum*.

Las formas mucosas se tratan habitualmente con terapia sistémica.

Los efectos adversos de los antimoniales pentavalentes sistémicos incluyen pancreatitis y toxicidad cardíaca, hepática y hematológica. Su administración intralesional no da problemas más allá de las molestias inherentes al procedimiento de la inyección. La anfotericina B liposómica, mucho menos tóxica, puede producir fiebre, escalofríos y dolor lumbar, y más rara vez nefrotoxicidad.

1.3 Brote de Fuenlabrada

Desde julio de 2009 y hasta la actualidad ha tenido lugar en el sur de Madrid y principalmente en la localidad de Fuenlabrada un aumento muy importante del número de casos de leishmaniasis (97 en 2010), lo que llevó a la declaración de un brote comunitario (25). Desde entonces y hasta diciembre de 2012 se declararon 466 casos considerados dentro del brote (incidencia media de 22.2 casos por 100 000 habitantes en ese periodo, y en concreto en Fuenlabrada 52.7/100 000 habitantes).

El estudio epidemiológico espacial mediante análisis de conglomerados (26) concluyó que la mayoría de los casos de este brote se concentraban en la zona noroeste de la localidad de Fuenlabrada, en las cercanías de un parque de reciente construcción (Bosquesur) donde se identificaron dos conglomerados espaciales para LV y uno para LC. Se observó una tendencia decreciente de casos en relación con la distancia al parque: Más del 70% de los casos vivían a menos de 1 km de la zona de riesgo. En esta zona se daban algunas circunstancias medioambientales destacables como son la superpoblación de liebres y la detección de densidades elevadas de *Phlebotomus perniciosus* (143.8 por m² de media, comparado con la media para Madrid de 30 por m² (25)).

La prevalencia de infección en los perros de la zona (<5%) no había aumentado con respecto a zonas cercanas o años previos. Buscando otros posibles reservorios se encontró el parásito en un 30% de las liebres (*Lepus granatensis*) analizadas, habiéndose demostrado asimismo por estudios de xenodiagnóstico la capacidad infectiva de éstas al flebotomo (27), y la preferencia del flebotomo por las liebres a la hora de alimentarse (28), por lo que parece probada la implicación en el brote de un ciclo silvestre paralelo al doméstico habitual. Posteriormente se llevaron a cabo los mismos estudios con respecto al conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*), también muy abundante en la zona, con resultados similares (29) que lo señalan también como un posible reservorio secundario.

Vemos por tanto como en esta zona se dieron las condiciones idóneas para la aparición de un brote: la urbanización de un área rural donde existía un reservorio muy abundante (de fácil reproducción en un entorno libre de depredadores), y las condiciones climatológicas y ecológicas favorables para el crecimiento del vector.

Otra peculiaridad del brote es el perfil epidemiológico del mismo. En los casos recogidos en España por el CMBD entre 2000 y 2010 (7) la enfermedad afectaba fundamentalmente a niños (30.5%) o pacientes inmunodeprimidos (36.1% pacientes VIH). Este es el perfil habitual en una zona endémica donde la población adulta ha ido adquiriendo cierto grado de inmunidad. Durante el brote de Fuenlabrada sin embargo los afectados han sido mayoritariamente adultos inmunocompetentes y de todas las edades (solo 14% en niños y solo 15% inmunocomprometidos). Las causas de esto no son bien conocidas; se ha atribuido a que se trate de una población no previamente inmunizada (7), pero no se dispone de datos de exposición previos en esta zona.

Llama también la atención la alta proporción de pacientes de origen subsahariano afectados (26): Representan menos del 3% de la población de Fuenlabrada, pese a lo cual

suman el 8.1% de todos los casos de leishmaniasis (36 pacientes) y el 20% de los casos de LV (32 pacientes). Se trata en su mayoría de pacientes oriundos de Guinea Ecuatorial y Nigeria.

La tipificación molecular de los aislados comprobó la presencia de cuatro genotipos diferentes en el brote, con predominio de una cepa poco común de *Leishmania infantum* (genotipo combinado L920) (30), que ya había sido descrita en Madrid desde 1992.

La afectación predominante de población inmunocompetente ha hecho pensar en la posibilidad de que se trate de cepas especialmente virulentas. Un estudio (31) evaluó la virulencia *ex vivo* de dos aislados obtenidos de *P. perniciosus* de la zona, comparándola con otra cepa conocida y concluyendo que eran más virulentos que ésta en términos de índice de infección de células dendríticas y macrófagos, y de respuesta inmune provocada (producción de citoquinas y actividad enzimática).

La mayoría de los casos del brote se acumularon entre el final del invierno y el principio de la primavera, como consecuencia del ciclo del vector en nuestro medio y el periodo habitual de incubación.

Aproximadamente dos tercios de los pacientes afectados durante el brote desarrollaron la forma cutánea y un tercio la visceral.

17 pacientes tuvieron una forma poco habitual de enfermedad conocida como leishmaniasis ganglionar (32), que ya había sido descrita previamente en el Mediterráneo. Estos pacientes presentaron una o varias linfadenopatías, de larga evolución al diagnóstico (mediana 60 días), en la mayoría de los casos limitadas a un área, y no manifestaron fiebre u otros síntomas acompañantes. En el 35% de los pacientes había existido una lesión cutánea previa al desarrollo de las adenopatías.

El diagnóstico se realizó mediante punción-aspiración con aguja fina del ganglio, que demostró linfadenitis granulomatosa no necrotizante con visualización de *Leishmania*. La serología fue negativa en la mitad de los pacientes. La evolución fue favorable en todos los casos, en algunos con dosis de Anfotericina B de solo 10mg/kg, dándose incluso una resolución espontánea sin tratamiento. Hubo un único caso que presentaba otros datos de LV (pancitopenia, esplenomegalia) y que no respondió a un ciclo inicial de anfotericina 21mg/kg, tratándose de nuevo con 40mg/kg con éxito.

Las formas viscerales presentaron la clínica típica y afectaron de forma predominante a varones (72%), también de acuerdo con lo descrito en la literatura. El diagnóstico se obtuvo en la mayoría de los casos mediante biopsia de médula ósea (visualización directa positiva en el 44%, PCR 91%). De los test serológicos realizados la mayor sensibilidad la dio el ELISA/IFAT, mientras que la especificidad fue máxima (100%) para el test rápido rk39. El tratamiento se realizó en todos los casos con Anfotericina B liposomal y el 14% de los pacientes sufrieron recaídas.

En cuanto a las formas cutáneas (33) el brote se ha caracterizado por el polimorfismo de las lesiones, con múltiples formas atípicas. La localización más habitual ha sido en zonas fotoexpuestas de las extremidades, y más de la mitad de los pacientes presentaban lesiones múltiples, en algunos casos (16%) alejadas entre sí. La incidencia en esta forma fue similar en hombres y mujeres. El diagnóstico se realizó en la mayoría de los casos (87%) por PCR en la biopsia cutánea (en más de la mitad de las biopsias no se identificó *Leishmania* por visualización directa). El 69% de los pacientes recibieron tratamiento, siendo el más habitual antimonio de meglumina intralesional 1-8 sesiones (1 sesión semanal).

Tras la declaración del brote se tomaron una serie de medidas por parte de las autoridades locales y regionales y las instituciones como captura de liebres y conejos y

eliminación de madrigueras, retirada de escombros y desechos de vegetación, desinsectación, así como una campaña de información a la población.

El pico máximo de incidencia se dio entre el verano de 2010 y el año 2011. A partir de 2012-13 (tras el inicio de las medidas de control) los casos descendieron gradualmente (24.4% de reducción de casos de LV entre 2012 y 2015 (34)). Según los últimos datos de Salud Pública de la comunidad de Madrid, hasta diciembre de 2017 se han reportado en total 727 casos de leishmaniasis en la zona del brote. El brote aún no se ha dado por finalizado.

1.4 Inmunidad frente a *Leishmania*

La forma clínica de leishmaniasis depende en gran medida de características intrínsecas del parásito como son tropismo y virulencia.

La mayoría de especies de *Leishmania* presentan un tropismo (cutáneo o visceral) determinado. Diferentes cepas de la misma especie también pueden presentar diferente tropismo. Así, en *L. infantum* (35) existen cepas viscerotrópicas (en inmunocompetentes dan LV: MON 27, MON 28, MON72, MON 77 y MON 187) y dermatrópicas (en inmunocompetentes dan LC: MON11, MON 24, MON 29, MON 33, MON 78 y MON 111). Sin embargo, existen algunas cepas (MON1, MON 34, MON 80 y MON 190) que dan ambas formas en inmunocompetentes, y en inmunodeprimidos es frecuente que se den casos de leishmaniasis visceral con especies que se consideran dermatrópicas.

Asimismo existen cepas aisladas únicamente en casos de LV en pacientes VIH, lo que sugiere que son cepas poco virulentas que en pacientes inmunocompetentes causan infección asintomática (35). Incluso dentro del mismo zimodema existen cepas con diferente infectividad (36), y estudios de subtipaje mediante marcadores microsatélites no han

encontrado una correlación clara entre genotipos, especificidad de huésped y forma clínica (37).

Campos-Ponce et al. (38) compararon diferentes factores de virulencia (resistencia sérica, infectividad de macrófagos, polimorfismos génicos) en cepas de *L. chagasi* de LC y LV en Honduras sin encontrar diferencias significativas. Lo compararon también con cepas de *L. infantum* mediterránea donde sí vieron que los polimorfismos de los genes de dos proteínas consideradas posibles factores de virulencia (LMPK y Cbp) se asociaban con el tropismo.

Por todo esto parece evidente que, además de las características inherentes al parásito, un factor determinante de la forma clínica de enfermedad es la respuesta inmunitaria del huésped (innata y adaptativa). Solo un pequeño porcentaje de los sujetos infectados van a desarrollar enfermedad. Asimismo, los pacientes curados de una LV presentan resistencia a la reinfección (39). Esto refleja la capacidad del sistema inmune para controlar al parásito y mantener una inmunidad protectora a largo plazo.

Existen grandes variaciones en el ratio de infección asintomática/sintomática en las poblaciones estudiadas en diferentes áreas geográficas, en probable relación con múltiples factores como la virulencia del parásito, el estatus nutricional del huésped (40,41), factores genéticos (42,43) y otros. Así por ejemplo en España se calcula en 50:1 (44), y en Etiopía 5.6:1 (45).

La inmunidad innata se desencadena tras la inoculación del parásito en la dermis del huésped. Las primeras células en llegar al lugar de la lesión son los neutrófilos, e inmediatamente después monocitos, macrófagos y células dendríticas. Las células dendríticas mediante la secreción de IL12 van a activar las células NK y la respuesta Th1.

Esta respuesta mediada por células CD4 helper 1 ha sido considerada clásicamente la respuesta eficaz a los parásitos. Las citoquinas más importantes en ella son el interferón gamma (INF-gamma) y el factor de necrosis tumoral (TNF), que controlan respectivamente la vía del óxido nítrico (para lisar los parásitos dentro de los lisosomas) y la formación de granulomas que contienen la infección localmente en la piel o los ganglios (formas asintomáticas, o leishmaniasis cutánea o ganglionar), evitando así su progresión. En estos pacientes la serología suele ser normal, al igual que los reactantes de fase aguda.

Cuando se da una respuesta de tipo Th2, de predominio humoral, se produce IL-10 (que suprime la respuesta Th1) e IL-4, y se activan linfocitos B que producen inmunoglobulinas. Estas no son efectivas para controlar la infección intracelular, por lo que los parásitos se replicarán rápidamente en el sistema reticuloendotelial y la infección se extenderá por diseminación linfática y vascular al hígado, médula ósea y bazo (LV). Se verán títulos elevados de anticuerpos.

En los modelos murinos esta dicotomía Th1-Th2 es bastante clara, mientras que en humanos infectados la respuesta inmune parece ser mixta en casi todas las formas clínicas (46), especialmente en las viscerales, donde citoquinas asociadas a respuesta Th2 (IL4, IL13) parecen tener también un papel protector.

En un estudio (47) con *L. braziliensis* que compara la respuesta inmune en pacientes con infección asintomática y con formas cutáneas tras tratamiento, se ve que si bien ambos tienen respuesta linfoproliferativa positiva, esta es menor en pacientes asintomáticos, siendo también menor la producción de INF-gamma, y en cambio mayor la de IL10. Los autores sugieren que la clave está en que los pacientes con infección asintomática tienen mejor habilidad para crear un equilibrio entre la inmunoregulación (IL10) y las CK efectoras (INF-gamma), lo que lleva a la destrucción parasitaria sin dar daño de tejidos.

Los parásitos desarrollan múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune (48–50). En primer lugar, pueden inhibir la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora de las células mieloides (interfiriendo con la vía del complemento, con la fusión de los fagolisosomas y con la presentación antigénica, inhibiendo la producción de citoquinas, escindiendo la proteína mTOR, etc.). Son factores de virulencia de gran importancia el lipofosfoglicano y la proteasa gp63 (leishmanolisina). En segundo lugar, entran en células como los fibroblastos, hepatocitos etc., que no son capaces de destruir el parásito y por tanto constituyen un medio seguro en el que sobrevivir. Además, activan la expansión de un tipo de células reguladoras que producen IL10 y por tanto inhiben la respuesta celular.

En la mayoría de pacientes en que tiene lugar una infección asintomática (al igual que en pacientes curados tras tratamiento), persiste sin embargo el parásito de forma latente en los tejidos al no ser capaz el huésped de eliminarlos de forma definitiva (se ha recuperado *Leishmania* en la piel, ganglios, médula ósea, hígado y sangre de pacientes que se curaron o nunca tuvieron síntomas de leishmaniasis (51–53), con el riesgo asociado de que si en algún momento de su vida el huésped pierde su capacidad inmune, pueda proliferar y ser capaz de producir enfermedad, incluso años después de producirse la infección (además de evidencia en estudios en ratones (54), existen varios casos descritos en la literatura de pacientes que manifiestan la enfermedad años después de la exposición, en el contexto de una inmunosupresión (55,56)).

1.5 Papel del TNF en la infección por *Leishmania*

El TNF-alfa es una citoquina implicada en múltiples vías de señalización en la inflamación, inmunidad, y muerte y supervivencia celular. Es producida por una gran variedad de células, pero principalmente por los macrófagos activados y las células T, en respuesta a diferentes mediadores endógenos y exógenos. Se sintetiza como una proteína

transmembrana, que posteriormente se escinde en la forma soluble. La forma soluble puede encontrarse en forma monomérica o trimérica.

Las funciones del TNF incluyen la activación macrofágica y de fagosomas, la diferenciación de monocitos a macrófagos, el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, y la formación de granulomas. Su papel es por tanto esencial en el control de patógenos intracelulares (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans*, etc.).

El TNF-alfa y el TNF-beta¹ comparten receptores de dos tipos (I o p55 y II o p75). Ambos receptores se expresan en prácticamente todos los tipos celulares, aunque la expresión de los de tipo II en condiciones fisiológicas está restringida a células inmunes y endoteliales. La expresión de estos receptores está también modulada por diferentes citoquinas. El receptor de tipo I se activa por las formas transmembrana y soluble del TNF, mientras que el tipo II se activa preferentemente por la forma transmembrana. La unión del TNF a estos receptores inicia la síntesis de mediadores de la inflamación. Los receptores del TNF pueden desprenderse de la superficie celular y actuar como CK antiinflamatorias al producir una inhibición competitiva de la acción del TNF.

Al igual que el resto de determinantes de la respuesta inmune a *Leishmania*, el papel exacto del TNF en el control de la infección sigue sin conocerse bien, si bien se considera que tiene una importancia clave (57). Además de colaborar con la actividad de macrófagos y neutrófilos, dirige la activación de células dendríticas en el sitio de infección, controlando por tanto la respuesta celular T (58).

¹ El TNF-beta se conoce actualmente como linfotoxina-alfa, quedando la denominación de TNF para el TNF-alfa. En este texto nos referiremos al TNF-alfa indistintamente como TNF o TNF-alfa

Diferentes estudios con *L. major* (59,60) mostraban mejoría de las lesiones y reducción de la carga parasitaria en ratones tratados con TNF (murino o recombinante), así como empeoramiento de las lesiones cuando se les inyectaba anticuerpos anti-TNF. En otro estudio (61) se bloqueaba la acción del TNF mediante una proteína de fusión del receptor tipo 1, con lo que desarrollaban lesiones graves que no curaban.

En un estudio en ratones a los que se suprimió el gen del TNF por recombinación homóloga, se vio que desarrollaban una forma visceral (62) rápidamente fatal.

En otro modelo murino con *L. donovani* se vio que los ratones knockout para el gen del TNF eran incapaces de controlar la infección, y además recaían tras tratamiento (63). En otro, el tratamiento de los ratones con suero anti-TNF-alfa provocaba un aumento de la carga parasitaria e imposibilitaba resolver la infección (64).

Se ha visto que el TNF transmembrana es capaz de controlar la infección incluso en ausencia de TNF soluble (65).

El efecto del TNF varía en los diferentes órganos. Así, en enfermedad visceral, en el hígado parece tener un papel clave en la resolución de la infección (mediante la formación de granulomas y el control de los parásitos) mientras que en el bazo es responsable del daño tisular y de la destrucción de la arquitectura esplénica que se considera causante en parte de la inmunosupresión secundaria en estos pacientes (66). Por otro lado, se le ha implicado también en la patogenia de las lesiones cutáneas en LC (67), y de hecho la pentoxifilina, un inhibidor de la síntesis de TNF-alfa, se ha usado en tratamiento combinado con los antimoniales para el tratamiento de LC (68) y LM (69).

Existen sin embargo estudios que sugieren la existencia de otros mecanismos que permiten controlar la enfermedad. Así, ratones deficitarios en los receptores de TNF

infectados por *L. major*, si bien no resolvían las lesiones, conseguían controlar la replicación parasitaria (70,71). Se ha propuesto que en ausencia de TNF las células T pueden activar a los macrófagos para la producción de óxido nítrico por vía de las proteínas CD40/CD40L y la integrina LFA-1 (72).

Se ha comprobado que en estudios con ratones deficientes en TNF el desarrollo de enfermedad varía según la cepa implicada (73). Esto, así como las dificultades intrínsecas a los diferentes modelos knockout utilizados (permanencia de genes de la línea original, eliminación de genes cercanos de importancia inmunológica etc.), podría explicar algunas de las contradicciones encontradas en diferentes estudios cuanto al papel del TNF (57).

1.6 Leishmaniasis en pacientes inmunosuprimidos

Los pacientes con alguna alteración de la vía de la inmunidad celular tienen más dificultades para contener la infección local y por tanto son más propensos a padecer las formas viscerales de la enfermedad. En concreto los grupos de mayor riesgo son los pacientes con infección crónica por VIH (en relación con el déficit de linfocitos CD4) y los pacientes con tratamiento inmunosupresor de la inmunidad celular, como los pacientes con trasplante de órgano sólido (TOS) o los pacientes con terapias biológicas que disminuyen la actividad del TNF.

Desde el inicio de la pandemia del VIH se han notificado en el sur de Europa más de 2000 casos de coinfección VIH-*Leishmania* (74), representando en algunos momentos más de la mitad de todos los casos de leishmaniasis visceral. Tras el inicio de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) el número de casos ha disminuido de forma notable en nuestro medio, mientras que aumenta el número de casos en inmunodeprimidos por otras causas, fundamentalmente por vía iatrogénica, de forma paralela al desarrollo de nuevos tratamientos reumatológicos, oncológicos etc. Así se han descrito numerosos casos en pacientes con

trasplante de órgano sólido (TOS) (75), trasplante de médula ósea, y pacientes en tratamiento inmunosupresor con azatioprina, metotrexato, corticoesteroides, ciclosporina o ciclofosfamida (76).

En los pacientes VIH están ampliamente descritas algunas peculiaridades con respecto a los pacientes inmunocompetentes: formas atípicas de enfermedad, diferente sensibilidad en los test diagnósticos, recaídas tras el tratamiento, etc. Los casos y series de casos publicados en pacientes con inmunosupresión de otra causa son muy heterogéneos y resulta complicado extraer conclusiones generalizables. En receptores de TOS se ha visto que la respuesta a tratamiento es mejor y el riesgo de recaídas menor que en pacientes VIH, aunque no equiparable al de población inmunocompetente (74). En estos pacientes, al contrario que en la coinfección VIH, no existen unas pautas generales de tratamiento y profilaxis secundaria.

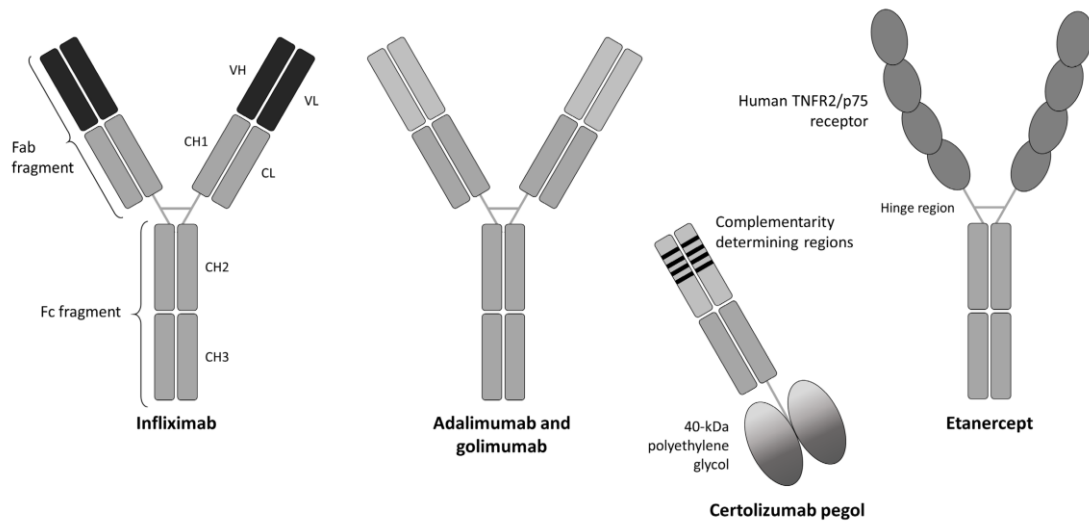
1.7 Fármacos anti-TNF

El TNF-alfa está implicado, además de en la respuesta inmune a infecciones, en la patogénesis de diferentes enfermedades inflamatorias, en las que parece que existe un desequilibrio entre la actividad de CK antiinflamatorias (IL4, 10 o 13) y el TNF y otras CK proinflamatorias. Así, se han encontrado concentraciones elevadas de TNF en los tejidos implicados en estas enfermedades (líquido sinovial, piel, intestino) donde promueve la respuesta inflamatoria (77).

En 1998 la FDA aprueba los primeros fármacos anti-TNF (infliximab en enfermedad de Crohn y etanercept en artritis reumatoide). Existen en la actualidad 5 fármacos comercializados con actividad anti-TNF: infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab y certolizumab. Están en desarrollo además nuevos fármacos, y se ha aprobado ya el uso de

varios *biosimilares*² de etanercept, infliximab y adalimumab (78). La Tabla 1 resume las características de los diferentes fármacos y la Figura 6 muestra su estructura molecular.

Figura 6: Estructura molecular de los fármacos anti-TNF. Extraído de (77)



Los anticuerpos monoclonales infliximab, adalimumab y golimumab son específicos contra el TNF-alfa en sus formas soluble (mono y trimérica) y transmembrana. Infiximab es un anticuerpo quimérico de origen murino (aproximadamente un 25% de sus aminoácidos son de origen murino). Adalimumab y golimumab tienen un 100% de origen humano, con una menor capacidad antigénica. La vía de administración es intravenosa en el caso de infliximab y subcutánea para adalimumab y golimumab. Estas moléculas tienen varios mecanismos de acción para inhibir la función del TNF: neutralizar su forma soluble o transmembrana mediante su unión al mismo, regulación negativa de citoquinas mediante vías de señalización inversas, apoptosis de células que expresan TNF transmembrana, o citotoxicidad mediada por anticuerpos o por complemento.

² Medicamentos muy similares, aunque no necesariamente idénticos biológicamente, pero comparables en eficacia, seguridad y calidad

Tabla 1 Fármacos anti-TNF. Adaptado de (77)

Fármaco (nombre comercial)	Tipo	Diana	Mecanismo de acción	Indicaciones*	Modo de administración, intervalo habitual**
Infliximab (Remicade®)	Anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico	mTNF, sTNF,	Neutralización, apoptosis, señalización inversa, CCDA, CDC	EII, AR, EA, APs, Ps	Iv, 6-8 semanas
Etanercept (Enbrel®)	Proteína de fusión de un receptor soluble tipo II con la fracción constante de una IgG humana	mTNF, sTNF TNFbeta	Inhibición competitiva, CCDA, CDC	AR, EA, APs, Ps, artritis idiopática juvenil	Sc 1 o 2 veces a la semana
Adalimumab (Humira®)	Anticuerpo monoclonal IgG1 100% humano	mTNF, sTNF	Neutralización, apoptosis, señalización inversa, CCDA, CDC	EII, AR, EA, artritis idiopática juvenil, APs, Ps, hidradenitis supurativa, uveítis	Sc cada 2 semanas
Golimumab (Simponi®)	Anticuerpo monoclonal IgG1 100% humano	mTNF, sTNF	Neutralización, apoptosis, señalización inversa, CCDA, CDC	EII, AR, EA, artritis idiopática juvenil, APs	Sc cada 4 semanas
Certolizumab pegol (Cimzia®)	Fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal IgG4 murino humanizado unido a dos moléculas de polietilenglicol	mTNF, sTNF	Neutralización, señalización inversa	EII, AR, EA, APs	Sc cada 2-4 semanas

* Existen diversos usos *off-label*

**Las dosis varían en ocasiones según la enfermedad y según la respuesta clínica

CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. CDC: Citotoxicidad dependiente de complemento mTNF: TNF transmembrana sTNF: TNF soluble

Etanercept es una proteína de fusión obtenida mediante la unión de un receptor soluble tipo II (obtenido por recombinación genética), a la fracción constante de una IgG humana, que le confiere estabilidad y mayor vida media. Es capaz de bloquear la acción del

TNF-alfa y de la linfotoxina (TNF beta) al unirse a ellos y evitar su unión a los receptores celulares. Se administra por vía subcutánea. Se une a la forma trimérica del TNF e interacciona con la forma transmembrana, pero con menor afinidad que infliximab.

Certolizumab pegol es un fragmento Fab' (fragmento que se adhiere al antígeno) de un anticuerpo monoclonal murino humanizado unido a dos moléculas de polietilenglicol. Reconoce y neutraliza el TNF-alfa humano, soluble y unido a membrana. Al no contener una porción Fc no induce la activación del complemento, toxicidad celular dependiente de anticuerpos ni apoptosis.

Las terapias biológicas basadas en disminuir la actividad del TNF se han mostrado útiles en el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn o la psoriasis. Existen algunas diferencias en el uso clínico de las moléculas. Así, infliximab y adalimumab tienen el espectro de acción más amplio mientras que etanercept no parece ser útil en sarcoidosis ni enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

1.7.1 Riesgo de infecciones

Dado el papel clave del TNF en la inmunidad celular, ha sido una preocupación desde la introducción en el mercado de estos fármacos la posibilidad de un aumento del riesgo de infecciones. Existe abundante literatura (ensayos clínicos, estudios postcomercialización, registros de pacientes) que ha intentado dar respuesta a esta pregunta, con resultados poco concluyentes y a menudo contradictorios. La mayoría de los estudios están realizados en pacientes con AR y con los fármacos más antiguos (fundamentalmente infliximab y etanercept y algunos con adalimumab).

Estos estudios tienen múltiples limitaciones y posibles factores de confusión. En los ensayos clínicos precomercialización el número de pacientes es pequeño por lo resulta difícil

evidenciar efectos secundarios poco frecuentes, suelen ser pacientes muy seleccionados (sin comorbilidades) y el uso del fármaco en ocasiones es diferente al de la práctica clínica. Los estudios observacionales no son aleatorizados y por tanto tienen menor fiabilidad estadística. En los registros de pacientes, si bien el número de pacientes suele ser elevado y se trata de datos de población y uso reales, los efectos adversos suelen estar infradeclarados. Además, se trata de pacientes con alteraciones de la inmunidad por su enfermedad de base, y los grupos control reciben tratamientos que también son inmunosupresores. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el uso de estos fármacos se hace en un número no desdeñable de ocasiones en indicaciones *off-label*, en las que está descrito un mayor número de efectos adversos que en las indicaciones aprobadas en ficha técnica (79).

Los primeros estudios realizados con infliximab en pacientes con artritis reumatoide (AR) mostraron un aumento del riesgo de infecciones (80), especialmente en los primeros meses de tratamiento (81,82), lo que se interpretó como reactivación de infecciones latentes.

Otro estudio en pacientes con AR (83) encontró un riesgo aumentado de infecciones en los primeros seis meses de tratamiento con infliximab, no así con etanercept (ni con infliximab más allá de 6 meses).

En un extenso estudio retrospectivo en Estados Unidos (84) en pacientes con diferentes enfermedades de base (AR, psoriasis, EII, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante), no se encontró un aumento de las infecciones durante los primeros 12 meses de uso de infliximab, etanercept y adalimumab en comparación con fármacos no biológicos.

Existen varias revisiones sistemáticas recientes que han abordado el riesgo de infección con estos fármacos. En la revisión Cochrane de 2011 (85) se encontró un aumento en la tasa de infecciones graves en relación al tratamiento control para los biológicos como grupo

y también para los anti-TNF (OR 1.41, 95% CI 1.13-1.75). Analizados individualmente, el único anti-TNF con riesgo aumentado fue certolizumab (OR 3.51, 95% CI 1.59-7.79). En un metaanálisis de 2015 (86) en pacientes con AR se concluyó que en comparación con el tratamiento tradicional, los fármacos biológicos a dosis estándar (OR 1.31, 95% IC 1.09-1.58) y a dosis alta (OR 1.90, 95% CI 1.50-2.39) se asociaron con un aumento en el riesgo de infecciones graves, no así a dosis bajas (OR 0.93, 95% CI 0.65-1.33).

Para otras enfermedades diferentes de AR existe menor evidencia. Las revisiones sistemáticas disponibles en relación a espondilitis anquilosante no muestran diferencias significativas en el riesgo de infección con estos fármacos vs. tratamiento convencional (87,88). En las revisiones disponibles en relación a psoriasis (89) o enfermedad inflamatoria intestinal (90) se ha visto un aumento del riesgo de infección, pero no de infecciones graves.

Existen varios estudios con etanercept en los que no se demuestra una mayor incidencia de infecciones (91), ni cambios sustanciales en la función inmune de estos pacientes (92), y existen también múltiples estudios que informan de un menor riesgo de infección con etanercept cuando se compara con infliximab o adalimumab (93,94).

En un estudio con datos del registro británico de pacientes con AR (95) no se encontró un aumento del riesgo de infección al comparar infliximab, etanercept o adalimumab con los fármacos antirreumáticos tradicionales (DMARDs), pero sí un riesgo aumentado de infecciones de piel y tejidos blandos, lo que sugiere un papel muy importante del TNF en la defensa de estos tejidos.

En un análisis posterior (96) de los mismos datos con diferentes modelos estadísticos y diferentes tiempos de seguimiento tras la suspensión del tratamiento, encontraron que la incidencia era mucho mayor (OR 4.6, 95% IC 1.8-11.9) en los pacientes en tratamiento anti-TNF si se estudiaban los primeros 90 días de tratamiento.

En un estudio con los datos del registro alemán (97), se concluyó un riesgo aumentado de infección que requiere hospitalización para el uso de estos fármacos (incidence rate ratio 1.8, 95% CI 1.2-2.7) , pero tras el análisis ajustado a diferentes variables concluían que la mayoría de este riesgo se asocia a la edad, comorbilidades y uso asociado de corticoides. Este es el único estudio que incluye el análisis de variables que cambian en el tiempo (estado funcional, cambios de tratamiento, etc.). Se vio que la incidencia descendía de forma importante tras los 3 primeros años de tratamiento, principalmente por dos razones: la pérdida de seguimiento o bien la suspensión del tratamiento en pacientes de alto riesgo, y el mejor control de la enfermedad que permitía además descender la dosis de corticoesteroides (ambos factores disminuirían el riesgo de infección). Este estudio aporta por tanto información de gran importancia y permite incluso estimar el riesgo de infección en un paciente en concreto basándose en su perfil.

Factores asociados en diferentes estudios a mayor riesgo de infección en estos pacientes son entre otros el uso previo de inmunosupresores tradicionales u otros fármacos anti-TNF (86); la edad mayor de 60 años, las enfermedades renal o pulmonar crónicas y el uso concomitante de corticoides (97).

1.7.2 Riesgo de enfermedades granulomatosas

Se ha estudiado más concretamente la relación entre el TNF y enfermedades granulomatosas: histoplasmosis, listeriosis, nocardiosis, coccidiomicosis y especialmente tuberculosis (TB). Los granulomas representan una estrategia del huésped para defenderse de patógenos intracelulares cuyo crecimiento no puede limitarse por otros mecanismos inmunes. Como hemos visto antes, el TNF tiene un papel clave en la formación de granulomas y en la activación de los macrófagos y por tanto en el control de estas enfermedades, por lo que se supone que su bloqueo puede dar lugar a mayor susceptibilidad a estas infecciones.

En el caso de la tuberculosis existen múltiples estudios observacionales en diferentes países que han evidenciado un aumento de la incidencia de enfermedad con estos fármacos (98), lo que se ha confirmado con varios metaanálisis (85,99). En una revisión realizada con datos del sistema estadounidense de farmacovigilancia de 1998 a 2002, con un subanálisis con datos de otros países, se encontró que el riesgo de infección granulomatosa era de dos a siete veces más con infliximab que con etanercept (100,101).

Además, en el caso de la TB el tiempo desde el inicio del tratamiento anti-TNF hasta la enfermedad era menor para infliximab, sugiriendo un papel importante de la reactivación de infección latente en la patogenia de estas enfermedades, mientras que la curva temporal en etanercept era sugestiva de primoinfección. El riesgo era máximo en los primeros 90 días de tratamiento. Estos hallazgos sugieren que solo infliximab y no etanercept interfiere con el mantenimiento de los granulomas, lo que explicaría también que este último no tenga utilidad terapéutica en enfermedades granulomatosas como enfermedad inflamatoria intestinal y sarcoidosis.

Las conclusiones de los análisis de los datos de los registros británico (102), portugués (103) y francés (104) son similares, sugiriendo menor riesgo para etanercept, y menor tiempo hasta el inicio de enfermedad con infliximab. Para otras infecciones granulomatosas también se ha descrito menor riesgo con etanercept (105).

Múltiples diferencias entre los diferentes fármacos explican las posibles diferencias en riesgo (93,105,106):

- En primer lugar, la diferente afinidad por el TNF transmembrana y soluble predice que el infliximab impediría la acción de TNFRp55 y 75 mientras que etanercept permitiría una acción parcial del 75. En un modelo murino (107) se vio que esta vía podría ser

suficiente para conferir resistencia a la infección por *Micobacterium tuberculosis* en ausencia de TNF soluble y linfoxina.

- En segundo lugar, la unión de infliximab al TNF es rápida e irreversible, al contrario que etanercept, lo que podría permitir la existencia de una concentración baja de TNF que mantuviera cierta capacidad de activación macrófaga y suficiente protección.
- Aunque ambos fármacos pueden inducir apoptosis de macrófagos en el tejido sinovial, en otros tejidos como la mucosa gastrointestinal solo los anticuerpos anti-TNF son capaces de producir apoptosis.
- La concentración pico de infliximab es mucho mayor por ser intravenoso. El aclaramiento de etanercept es mucho más rápido (13 veces mayor) que el de adalimumab o infliximab.
- Adalimumab e infliximab parecen inhibir la expresión de INF-gamma (probablemente de forma indirecta), al contrario que etanercept.

El inicio de estos tratamientos está contraindicado en infecciones activas (infecciones bacterianas que precisen antibioterapia, hepatitis víricas agudas o crónicas, herpes zoster, TB, infecciones fúngicas, úlceras cutáneas, etc.). En el caso de la infección tuberculosa, en que parece claramente establecido el riesgo de reactivación de infección latente al comenzar estas terapias, existe un protocolo ampliamente aceptado para retrasar el inicio del tratamiento hasta haber descartado y en su caso tratado una infección latente. Diferentes autores han propuesto que este cribado se haga también con otras infecciones (81).

Aunque no existe ningún estudio que investigue específicamente el riesgo de leishmaniasis en estos pacientes, se han descrito desde el comienzo de este siglo varias decenas de casos de leishmaniasis visceral, cutánea y mucosa en pacientes bajo tratamiento anti-TNF (13,107-150).

Hay casos descritos con todos los fármacos del grupo, aunque la mayoría son de pacientes con etanercept, infliximab o adalimumab (que son por otra parte fármacos comercializados hace más tiempo y de uso más extendido). Se han descrito casos de las formas cutánea, visceral y mucosa, casos en los que conviven simultánea o consecutivamente diferentes localizaciones (115,145) y casos con localizaciones atípicas (sinovial (146)). Se trata de casos aislados, de manejo heterogéneo y difícil de estandarizar. La inmensa mayoría de pacientes estaban siendo tratados con otros inmunosupresores además de los anti-TNF, o los habían utilizado en los últimos meses.

Estos casos evidencian las múltiples incertidumbres que existen acerca de estos pacientes: cuál es el riesgo real de enfermedad en esta población, el interés o no de un cribado y en su caso del tratamiento de infección latente, cual es el régimen de tratamiento idóneo, la necesidad o no de profilaxis secundaria, la necesidad o no de suspender el tratamiento anti-TNF (o la posibilidad de reiniciarlo tras curación), etc.

En cuanto al riesgo comparativo de unos y otros fármacos, en un estudio (152) que realiza un modelo *in vitro* con macrófagos infectados por *Leishmania*, cultivados con células T, comparan el efecto de diferentes fármacos y concluyen que adalimumab, infliximab y uno de sus biosimilares afectan negativamente a la infección dado que reducen la proliferación de linfocitos T y aumentan el número de macrófagos afectados, mientras que certolizumab no afecta a la proliferación de células T o las tasas de infección. Estudian también una forma pegilada de infliximab que, al igual que certolizumab, mejora la eliminación de *Leishmania*. Los autores sugieren por tanto que certolizumab sería el fármaco más seguro de los estudiados para pacientes que vivan en zonas endémicas.

Usando los datos de los casos europeos publicados hasta 2010 (143), Zanger et al. estimaron el riesgo relativo de leishmaniasis con cada fármaco (adalimumab, infliximab y

etanercept), concluyendo que es ocho veces mayor en adalimumab o infliximab que en etanercept. Esto ha llevado a algunos autores (135,143) a sugerir que en zonas endémicas para *Leishmania* se use preferentemente este fármaco.

Uno de los posibles factores de confusión al analizar estos casos y en general el riesgo de infección asociado a los fármacos anti-TNF es el uso concomitante, previo y/o posterior, de otros fármacos anti-TNF o de otros inmunosupresores en la inmensa mayoría de pacientes. Existen múltiples casos publicados de leishmaniasis en pacientes con enfermedades reumatológicas en tratamiento únicamente con inmunosupresores “clásicos”.

Los corticoides interfieren con las funciones efectora, supresora y citotóxica de los linfocitos T, mediante el bloqueo de la expresión de citoquinas, aumentando la susceptibilidad a infecciones, especialmente intracelulares (153). El riesgo de infecciones graves asociado a su uso, especialmente a dosis altas, está ampliamente estudiado (98). En un modelo murino de infección crónica con *Leishmania*, el uso de esteroides se asoció a un descenso en la producción de INF-gamma y TNF-alfa así como de IL2 e IL4, y a un aumento de la proliferación de amastigotes en el bazo (154). Muchos de los casos de leishmaniasis descritos en la literatura asociados al uso de corticoides son atípicos (frecuentemente formas mucosas), graves, con dificultades para el diagnóstico y respuesta parcial al tratamiento (153,155,156). También se ha asociado su uso a reactivación de enfermedad latente (157).

En cuanto al uso de metotrexato, la mayoría de los casos publicados de leishmaniasis están asociados a su uso en combinación con otros inmunosupresores, pero existen también casos en que es el único fármaco implicado (158–161). El metotrexato inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos y la proliferación de linfocitos T, disminuyendo la activación de los macrófagos y la respuesta contra el parásito (158).

Paradójicamente, para las formas cutáneas se ha propuesto tanto el uso de metotrexato (162) como el bloqueo anti-TNF (163) como tratamientos coadyuvantes, que permitirían disminuir la inflamación local sin afectar al control del parásito.

1.8 Detección de infección latente. Marcadores de curación y recidiva

La existencia de infecciones por *Leishmania* asintomáticas hace de gran interés clínico y epidemiológico el desarrollo e instauración de una técnica que permita detectar a estos sujetos. Por un lado, sería una herramienta clave para la vigilancia epidemiológica y también para evaluar los resultados de los programas de eliminación. Por otra parte, se asume que los pacientes asintomáticos pueden actuar como reservorios latentes, aunque no se ha demostrado que sean infectivos (164).

Asimismo, sería muy útil en pacientes que van a ser inmunosuprimidos (para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o bien para un trasplante, por ejemplo) y que podrían hipotéticamente sufrir una reactivación de la enfermedad, si bien actualmente no se recomienda la profilaxis primaria en estos pacientes (tampoco en VIH).

La OMS sugiere utilizar un método serológico (aglutinación, IFAT o ELISA) conjuntamente con un método que aumente la especificidad (western blot o PCR) para la detección de infección asintomática en estudios epidemiológicos. Además, recomienda realizar una serología a pacientes que vivan en zonas endémicas antes de iniciar una inmunosupresión farmacológica (corticoides, metotrexato, anti-TNF...), y establece que “frecuentemente” precisarán profilaxis secundaria hasta que finalice la inmunosupresión (8).

Otros autores apoyan también la realización de alguna prueba de cribado en estos pacientes, previo al inicio de tratamiento e incluso de forma periódica posteriormente, si bien hay diferencias de opinión en cuanto al test óptimo (76). La sensibilidad de la serología para la detección de infección asintomática es baja (165) y muy variable según el test utilizado (166).

Actualmente se están buscando nuevos antígenos recombinantes que puedan aumentarla (167).

Algunos estudios utilizan la PCR (168) o qPCR (169) en sangre como métodos de cribado, pero se ha visto que la positividad de la PCR en estos pacientes es intermitente (170), dada la baja parasitemia y la corta vida media del DNA (24h). Además, los resultados varían dependiendo de la técnica o secuencias utilizadas (existen múltiples técnicas, pocas han sido validadas en un gran número de muestras y ninguna es a día de hoy la de referencia).

Una prueba que se ha utilizado ampliamente en estudios epidemiológicos (44,171) es la **leishmanina o test de Montenegro**. Se trata de un test cutáneo de hipersensibilidad retardada a la inyección intradérmica de antígenos de *Leishmania*, similar al que se realiza para tuberculosis. Es negativo en enfermedad activa y también en pacientes VIH y otros inmunodeprimidos que presentan anergia. Esta prueba no se puede realizar en Europa en la actualidad dado que no se halla comercializado un reactivo de uso en humanos. Además se trata de una prueba poco estandarizada, existiendo diferencias importantes de sensibilidad y especificidad entre los diferentes antígenos utilizados (172). Por otra parte, la necesidad de “leer” el resultado 48h después de la inyección le resta practicidad en zonas endémicas.

En la actualidad se están desarrollando otras técnicas *in vitro*, basadas también en la existencia de memoria inmunológica. Estas consisten en la estimulación de células mononucleares o sangre completa con diferentes antígenos de *Leishmania* para evaluar la respuesta inmune. El antígeno más utilizado es el SLA, antígeno soluble de *Leishmania*.

Para medir la **respuesta celular linfoproliferativa** tras estimulación con SLA (Cellular Proliferation Assay to Soluble *Leishmania* Antigen, CPA-SLA) se aíslan células mononucleares de muestras de sangre periférica, y se cultivan en presencia de SLA. La proliferación celular se

expresa como un índice de estimulación, con un punto de corte que define respuesta positiva, que sería indicativa de la existencia una respuesta celular específica contra el parásito. Se ha propuesto su uso para predecir recaídas post-tratamiento en sujetos VIH (y por tanto como criterio para decidir si retirar la profilaxis secundaria) (173), y para detectar exposición a *Leishmania* y confirmar cura en pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido (174). En estos últimos se ha visto que, a pesar de la inmunosupresión farmacológica, algunos pacientes son capaces de desarrollar una respuesta específica y efectiva frente al parásito. Esta técnica se explica en detalle más adelante (ver Material y Métodos).

Otras técnicas similares evalúan el perfil de citoquinas asociado a la estimulación antigénica. El perfil encontrado tanto en pacientes curados como en pacientes expuestos asintomáticos (que se entiende que han tenido una infección subclínica) se caracteriza por la producción elevada de INF-gamma y también de IL2 y TNF-alfa (175–177). La concentración de citoquinas se puede medir por ELISA o técnicas inmunocromatográficas, siendo por tanto técnicas más sencillas de implantar, que se han propuesto como marcadores de curación, para la detección de infección asintomática y para monitorizar la respuesta al tratamiento. Otros biomarcadores estudiados (178) son las quimioquinas IP10 y MIG, así como la proteína MCP-1 (179), que parecen encontrarse en mayor concentración y por tanto podrían ser marcadores más robustos.

La más desarrollada hasta el momento es una técnica en para medir la producción de INF-gamma en sangre completa (IGRA, Interferón gamma release assay) modificada de la utilizada para la detección de infección tuberculosa latente (QuantiFERON®). Se ha utilizado para estudiar los perfiles de producción de citoquinas en diferentes formas de enfermedad (172,180) y se han realizado ensayos preliminares para evaluar su utilidad en la estimación de infección latente en áreas endémicas (181).

Se ha visto una buena correlación entre los resultados del test de leishmanina y de la proliferación celular y producción de INF-gamma tras estimulación con SLA (182). Estas técnicas de estimulación con SLA aparecen ya en las últimas recomendaciones de la OMS para la Región Europea como posibles sustitutos para el test de leishmanina (22).

Ante la posibilidad de recidiva de la enfermedad, otra de las cuestiones por resolver, especialmente en población inmunodeprimida, sería si existe algún marcador que establezca que la enfermedad está curada o que pueda informar de una posible recaída. Como hemos visto, tanto el test de linfoproliferación CPA-SLA como la medición de interferón gamma se han propuesto como marcadores de curación (si son positivos) o de recidiva (si negativizan). La serología o la PCR presentan para este fin similares limitaciones que para la detección de infección asintomática. La PCR suele negativizar rápidamente tras las primeras dosis de tratamiento mientras aún persisten las manifestaciones clínicas, y un resultado negativo no excluye enfermedad activa en los diferentes órganos. La serología por su parte puede tanto negativizar como permanecer elevada durante meses o años tras la curación (183).

2 HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Existe, como hemos visto, escasa evidencia del riesgo de leishmaniasis en pacientes inmunodeprimidos no VIH, y en concreto en pacientes bajo tratamiento anti-TNF.

En el contexto de un brote único en Europa hemos tenido la oportunidad de intentar conocer mejor la evolución inmunológica de estos pacientes antes y después del tratamiento anti-TNF, los factores de riesgo para padecer leishmaniasis visceral, y las mejores pautas de manejo tanto de pacientes de alto riesgo como de pacientes enfermos.

Los habitantes de Fuenlabrada han tenido una alta tasa de exposición a *L. infantum*, y un porcentaje de esa población no habría eliminado el parásito a pesar de estar asintomática.

Estimamos que la incidencia global de enfermedad será superior en los pacientes con fármacos anti-TNF que en la población inmunocompetente. Identificar las formas de presentación clínica y los potenciales factores de riesgo permitiría diagnosticar a los pacientes de forma precoz. Partimos de la hipótesis de que los resultados de los test parasitológicos e inmunológicos de los pacientes expuestos se alterarían después de iniciar tratamiento con terapias biológicas, suponiendo que el uso de estos test antes o durante el tratamiento permitiría identificar pacientes asintomáticos con alto riesgo de enfermedad.

Los objetivos del presente estudio son:

1. Estimar la prevalencia de exposición a *Leishmania infantum* en pacientes en tratamiento anti-TNF asintomáticos en una zona de alta endemia y estimar el riesgo de estos pacientes en tratamiento anti-TNF, expuestos y asintomáticos, de evolucionar a enfermedad activa.
2. Calcular la incidencia acumulada y la tasa de incidencia de leishmaniasis visceral y

cutánea en la cohorte de pacientes en tratamiento anti-TNF que viven en la zona del brote.

3. Describir el cuadro clínico y evolución de los pacientes en tratamiento inmunosupresor (corticoesteroides, metotrexato y fármacos anti-TNF) que han desarrollado la enfermedad durante el brote.
4. Determinar los factores de riesgo para la exposición a *Leishmania* y para el desarrollo de enfermedad en pacientes en tratamiento anti-TNF.
5. Validar la utilidad del test de linfoproliferación a SLA (Cellular Proliferation Assay to Soluble *Leishmania* Antigen, CPA-SLA) en el manejo de los pacientes en tratamiento inmunosupresor.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Ámbito del estudio, diseño y muestras

Fuenlabrada es un municipio situado en el suroeste de la Comunidad de Madrid, a 22 km de la capital. Posee una superficie de 39.41 km², y una población de 194 669 habitantes (INE 2017), siendo actualmente el cuarto municipio más poblado de la Comunidad. Desde los años 70 tuvo un crecimiento demográfico exponencial, debido en gran parte a las migraciones desde Andalucía y Extremadura en los años 80 y en las últimas décadas a la migración extranjera. De forma paralela a este crecimiento demográfico, pasó de ser un entorno rural y agrícola a urbano.

El Hospital Universitario de Fuenlabrada (HUF) es una empresa pública con personalidad jurídica propia, creada por la Ley 13/2002 de la Comunidad de Madrid. Está adscrito a la Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid a través de la Viceconsejería de Asistencia Sanitaria, y en la prestación de asistencia sanitaria funcionalmente a través del Servicio Madrileño de Salud (SERMAS). Inició su actividad en enero de 2004 y cubre la asistencia sanitaria de los habitantes de Fuenlabrada, Moraleja de Enmedio y Humanes (población asignada aproximada 219 000 personas), de la antigua Área 9 hasta la creación del Área Única en 2011.

3.1.1 Objetivos 1, 2 y 4

Se realizó un seguimiento observacional y prospectivo de la cohorte de individuos en tratamiento con fármacos anti-TNF (adalimumab, etanercept, golimumab, infliximab o certolizumab) en el Hospital Universitario de Fuenlabrada (“cohorte anti-TNF”) desde el inicio del brote (junio de 2009) hasta diciembre de 2015. Se trata en su mayoría de pacientes en seguimiento por patologías dermatológicas, reumatológicas o digestivas, en las consultas de dichas especialidades. Al tratarse de una medicación de dispensación exclusivamente

hospitalaria, todos los pacientes de la “cohorte anti-TNF” se reclutaron a través del servicio de Farmacia del Hospital.

3.1.2 Objetivo 3

Para el estudio descriptivo de los casos de enfermedad activa, se recogieron de forma retrospectiva los datos de todos los pacientes atendidos en el HUF entre el 1 de junio de 2009 y el 31 de diciembre de 2015 con diagnóstico de leishmaniasis (visceral, mucosa o cutánea) que estuvieran en tratamiento inmunosupresor (corticoides, metotrexato, fármacos anti-TNF). A éstos se les realizaron las pruebas complementarias habituales de la práctica clínica a criterio de su médico según la sospecha diagnóstica inicial y su evolución.

Desde enero de 2013 a estos pacientes se les extrajeron muestras enviadas al Instituto de Salud Carlos III para la realización de los mismos test que a los pacientes descritos posteriormente en el objetivo 5: test parasitológicos y serológicos, el test de linfoproliferación con SLA (CPA-SLA) y en algunos casos la detección de interferón gamma. Estas determinaciones se realizaron por tanto en todos los pacientes tras el tratamiento (curados), y en los pacientes que enfermaron con posterioridad a dicha fecha, se solicitaron también al diagnóstico (con la enfermedad activa).

Se excluyeron los pacientes de nuestra zona inmunodeprimidos por causa de un trasplante de órgano sólido, dado que realizan seguimiento en otro centro. También se excluyeron los pacientes menores de 18 años. Tras el alta los pacientes fueron seguidos hasta el 31 de diciembre de 2017.

3.1.3 Objetivos 1 y 5

Para calcular el tamaño muestral necesario para estimar la exposición a *Leishmania* en pacientes asintomáticos (objetivo 1) tomamos la “cohorte anti-TNF” en ese momento (agosto de 2013, 196 pacientes), y con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 5%, así como

una proporción estimada de exposición a *Leishmania* del 15% (en base a los datos obtenidos de la cohorte de pacientes VIH (184)), obtuvimos un tamaño muestral de 98 pacientes.

Se reclutaron en total 104 individuos asintomáticos de esta cohorte, que incluyeron todos los pacientes que iniciaron tratamiento anti-TNF entre el 1 de agosto de 2013 y el 31 de julio de 2014, así como una muestra de la “cohorte anti-TNF” en esa fecha. Estos individuos que estaban en tratamiento anti-TNF antes del inicio del estudio se reclutaron mediante llamada telefónica por orden alfabético del primer apellido a un listado de los pacientes separados por los diferentes fármacos.

Para estos, los criterios de inclusión fueron:

- Individuo que hubiera recibido al menos un mes de tratamiento anti-TNF durante el primer año de duración del estudio, o que hubiera comenzado el mismo en dicho periodo.
- Mayor de 18 años.
- Que concediera por escrito su consentimiento para participar en el estudio.

Los criterios de exclusión fueron:

- Individuo que no tuviera al menos una analítica durante el primer año de duración del estudio.
- Individuo que no completara al menos un mes de tratamiento con anti-TNF.

A todos ellos se les realizó un seguimiento clínico hasta el 31 de diciembre de 2017 y un seguimiento analítico durante un año desde su inclusión en el estudio. Se realizó una analítica basal a su inclusión en el estudio (en los pacientes que iniciaron terapia biológica durante el estudio esta determinación se realizó en el mes previo al inicio de la misma), y analíticas posteriores a los 6 y 12 meses de su inclusión en el estudio (0, +6, +12). En el caso de

los individuos que iniciaron terapia tras su inclusión en el estudio, también se realizó una analítica a los 2 meses del inicio del tratamiento (Pre-tratamiento, +2, +6, +12).

Cada analítica constaba de:

- Hemograma y bioquímica básica con perfil hepático y reactantes de fase aguda (realizada en Servicio de Análisis Clínicos del HUF).
- Una muestra enviada a la Unidad de Chagas y Leishmaniasis del Centro Nacional de Microbiología/Instituto de Salud Carlos III, donde se realizaron:
 - Análisis parasitológicos (Cultivo, PCR, PCR cuantitativa).
 - Análisis serológico (Tira inmunocromatográfica basada en rK39, ELISA e IFAT).
 - Caracterización de la respuesta inmune celular incluyendo análisis por citometría de las poblaciones celulares circulantes (CD4+, CD8+, células B, NK)
 - Estudio de linfoproliferación celular (o test de transformación linfoblástica), para cuantificar la respuesta celular específica frente a los antígenos del parásito y medir los niveles de citoquinas.
 - Método de secreción de IFNgamma (IGRA) ELISpot para determinar la respuesta celular.

Estos test se explican detalladamente más adelante.

3.2 Definiciones

Prevalencia: proporción de individuos de un grupo o una población que presentan un evento determinado en un momento o periodo determinado de tiempo (prevalencia de periodo).

Incidencia: número de individuos que desarrollan una enfermedad en un periodo determinado y en una población determinada.

Tasa de incidencia (TI): o densidad de incidencia, es la relación entre el número de nuevos casos a lo largo de un periodo concreto y la suma de los períodos de riesgo de cada uno de los individuos enfermos a lo largo del período que se especifica.

Incidencia acumulada (IA): es la proporción de individuos que desarrollan el evento durante el periodo de seguimiento de la cohorte.

Enfermo de leishmaniasis: paciente sintomático en relación con infección documentada por *Leishmania* (Se requiere visualización al microscopio de *Leishmania*, aislamiento de *Leishmania* por cultivo o detección de DNA de *Leishmania* por PCR en cualquier órgano o en sangre) o con serología positiva.

Paciente con exposición a *Leishmania* (“paciente expuesto”): paciente con infección documentada por *Leishmania*, serología positiva o respuesta celular positiva para *Leishmania*.

En el caso de pacientes con resultados en rango dudoso de CPA-SLA o serología, se ha considerado expuesto si tiene alguna otra determinación positiva, descartándose para el análisis los pacientes que tuvieran únicamente resultados en rango dudoso.

Paciente con exposición a *Leishmania* asintomático: paciente que cumple la definición de exposición previa y se encuentra asintomático.

3.3 Métodos

3.3.1 Objetivo 1

Para estimar la prevalencia de exposición a *L. infantum* del total de la “cohorte anti-TNF”, se ha analizado el número de individuos expuestos de la muestra de pacientes asintomáticos reclutada y se ha extrapolado al total de la “cohorte anti-TNF” incluyendo los pacientes enfermos.

Se realizó un seguimiento de los pacientes expuestos asintomáticos durante el periodo de estudio para valorar el riesgo de desarrollar enfermedad activa.

3.3.2 Objetivo 2

Para el cálculo de la incidencia acumulada y la tasa de incidencia se han usado los datos del Servicio de Farmacia del Hospital sobre el número de pacientes bajo tratamiento anti-TNF al inicio del brote y durante el mismo, así como la duración de estos tratamientos.

3.3.3 Objetivo 3

Se ha realizado un análisis descriptivo de los casos de leishmaniasis visceral, mucosa y cutánea ocurridos en pacientes en tratamiento inmunosupresor entre el 1 de junio de 2009 y el 31 de diciembre de 2015, incluyendo el cuadro clínico, diagnóstico, tratamiento, evolución, recaídas etcétera.

Se recogieron de forma retrospectiva los datos sociodemográficos y clínicos de los pacientes ingresados en nuestro centro con diagnóstico de leishmaniasis visceral o mucosa. Por otra parte, se analizaron los datos recogidos y cedidos por el Servicio de Dermatología y el Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública sobre los casos de leishmaniasis cutánea.

La distancia entre el domicilio de los pacientes y el parque se calculó midiendo la distancia más corta en línea recta al límite más cercano del parque, mediante un mapa online (Google Maps; Google Inc., Mountain View, CA).

3.3.4 Objetivo 4

Se han analizado los posibles factores de riesgo para exposición a *Leishmania*, así como para leishmaniasis visceral, mucosa o cutánea en estos pacientes, comparando las cohortes de pacientes expuestos/no expuestos y enfermos/expuestos asintomáticos.

Se contrasta la hipótesis nula que presupone la independencia entre la variable dependiente (enfermo/expuesto asintomático) y las variables independientes: Edad, sexo, nacionalidad, enfermedad de base que motiva el tratamiento inmunosupresor, otros factores de inmunodepresión, tipo de tratamiento anti-TNF, inmunosupresores asociados (corticoides, metotrexato) y distancia al parque Bosquesur. Para expuesto/no expuesto las variables independientes analizadas han sido edad, sexo y distancia al Parque.

Para ello se ha realizado un análisis univariante mediante las pruebas Chi cuadrado/test exacto de Fisher para las variables nominales, U de Mann-Whitney para las variables ordinales y T de Student para las variables paramétricas, y posteriormente dos modelos de regresión logística binaria para valorar los posibles factores de confusión. Para las variables que presentan una asociación estadísticamente significativa se ha calculado el odds ratio con un intervalo de confianza del 95%.

3.3.5 Objetivo 5

Se describen los resultados del test de linfoproliferación CPA-SLA en las diferentes formas clínicas y diferentes etapas de enfermedad en estos pacientes, y se analiza su utilidad como marcador de curación, como predictor de recidiva tras un episodio de leishmaniasis visceral, como método de cribaje de infección asintomática y como predictor del riesgo de enfermedad en pacientes expuestos, comparándolo en cada caso con otros posibles marcadores (test parasitológicos, serológicos, INF-gamma). Para el análisis de los posibles marcadores de curación se ha empleado el estadístico Chi cuadrado para valorar la asociación entre la variable dependiente (enfermedad activa/curada) y las variables independientes (positividad de los distintos test), calculando en caso de significación estadística el odds ratio con un intervalo de confianza del 95%.

3.4 Técnicas de laboratorio (Instituto de salud Carlos III)

3.4.1 Cultivos en medio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle)

Se cultivaron los aspirados y biopsias de médula ósea realizadas a los pacientes enfermos de leishmaniasis visceral, y las células mononucleares de sangre periférica en todos los pacientes. La presencia, viabilidad y cantidad de parásitos se determina mediante el cultivo en medio NNN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Leishmania* en la médula ósea y células de sangre periférica, y la observación al microscopio, tras tinción de Giemsa, del aspirado de médula ósea.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son resuspendidas en NET-10 y se cultivan en medio NNN 50 µl/muestra. Los cultivos se mantienen en estufa a 27°C de temperatura y son examinados cada 7 días mediante microscopía para determinar la presencia/ausencia de parásito. La muestra es considerada negativa cuando no se observan promastigotes tras 28 días de cultivo.

3.4.2 Aislamiento de ADN genómico y PCR en tiempo real

El aislamiento de ADN genómico y la PCR en tiempo real o qPCR se realizaron según los métodos descritos por Cunha et al (185). Se obtiene el ADN genómico a partir de 100 µl de sangre con anticoagulante citrato-EDTA, mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. El ADN precipitado se resuspende en agua destilada estéril ajustando la concentración a 10 ng/µl (5x10⁴ parásitos/µl), tras lectura espectrofotométrica a 260 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, USA). La detección del parásito se realiza mediante un protocolo de PCR anidada específica del género *Leishmania* (LnPCR). Esta técnica se caracteriza por tener una gran sensibilidad al contar con dos pasos de amplificación y una alta especificidad al utilizar dos parejas de cebadores distintos en cada paso. La diana de la reacción de amplificación es la región variable del gen que codifica el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma que presenta un bloque de secuencia que es conservado para todo el

género *Leishmania*, al mismo tiempo que presenta diferencias con otros organismos. De este modo, la LnPCR permite amplificar todas las especies de *Leishmania* de manera específica sin obtener resultados positivos falsos.

PCR cuantitativa: Para cuantificar la carga parasitaria se realizó una técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello se emplea el termociclador de alta velocidad LightCycler (Roche Diagnostics, España) y el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, España).

3.4.3 Estudio de la respuesta inmune

Se realizó una evaluación de la respuesta tanto celular como humoral. Esta última se realizó mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y de inmunoensayo enzimático (ELISA) frente al antígeno soluble de *L. infantum* (SLA) y frente al antígeno recombinante rK39. La respuesta celular frente a *Leishmania* se midió mediante la prueba de linfoproliferación *in vitro* frente a SLA.

3.4.3.1 Determinación de la respuesta inmune humoral

- **Inmunofluorescencia indirecta (IFI):** Los análisis se realizan con las muestras de plasma utilizándose una suspensión de promastigotes de *L. infantum* (MHOM/FR/1978/LEM-75) fijados en un portaobjetos mediante acetona. En cada portaobjetos se incluye un control negativo y uno positivo. Tras una incubación de 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C, se realizan tres lavados con PBS (solución salina tamponada con fosfato) a temperatura ambiente mediante agitación ligera y posteriormente se procede a realizar diluciones desde 1/20 hasta 1/640 para determinar los niveles totales de IgG. Para esto, se utiliza el anticuerpo anti-IgG canino conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ICN, Biomedical Incorporation, USA) y el colorante azul de Evans (Sigma, USA), diluidos 1/150 y 1/1000 respectivamente. La observación se realiza mediante un microscopio de fluorescencia (Dialux 20EB, Leitz,

Alemania), estimándose la prueba como positiva cuando la muestra presenta un título de anticuerpos igual o superior a 1/80.

- **Inmunoensayo enzimático (ELISA):** Se realiza la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos frente a los antígenos rK39 y SLA en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Dinamarca). La sensibilización de las placas se hace diluyendo los antígenos en tampón carbonato (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 28 mM, pH 9.6), empleando rK39 y SLA en cada pocillo. Tras la incubación durante toda la noche a 4°C, las placas se bloquean durante una hora con 200 μl de PBS Tween 20 (PBS-T) al 1% en el caso de rK39 y PBS-T al 0.3% con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% para SLA. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se procede al lavado de las placas con PBS-T al 0.1% cinco veces. A continuación, se añaden 50 μl de los sueros a analizar y transcurrida una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se procede al lavado de las placas según describimos anteriormente. Las muestras se incuban con la proteína A conjugada con peroxidasa (Zymed Laboratories Incorporation, USA) diluida en PBS-T al 0.1% 1/8000 durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavando a continuación. Se añade el sustrato ácido benzotiazolina azino-sulfónico (ABTS) siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma, USA) y la reacción se detiene con dodecil sulfato sódico (SDS, Sigma, USA) al 5%, realizándose la lectura a una absorbancia de 405 nm mediante un espectrofotómetro para placas ELISA (Merk ELISA System MIOS, Merk, Alemania). Los datos del cut-off del ELISA son los siguientes: ≤ 0.139 negativo, 0.140-0.169 dudoso, ≥ 0.170 positivo.

- **Tira inmunocromatográfica basada en rK39:** Se trata de unas tiras reactivas compradas a los laboratorios Leti, y utilizadas según las instrucciones del fabricante.

3.4.3.2 *Determinación de la respuesta inmune celular*

- **Obtención del Antígeno soluble de *Leishmania*:** El antígeno soluble de *Leishmania* se obtiene a partir de un cultivo de promastigotes en fase estacionaria de la cepa: JPC strain, MCAN/ES/98/LLM-722 de *L. infantum*. Se realizan lavados consecutivos en PBS (phosphate-buffered saline), tras obtener el cultivo. El precipitado celular se centrifuga a 1000 g durante 20 min a 4°C. Posteriormente se vuelve a suspender en un buffer de lisis (50 mM Tris/5 mM EDTA/HCl, pH 7) realizándose tres ciclos de congelado/descongelado rápido seguido por tres pulsos con un sonicador durante 20 segundos a 40w. La solución se centrifuga a 27000 g durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante es alicuotado y almacenado a -80°C hasta su uso. La composición del homogeneizado se comprueba mediante electroforesis SDS-PAGE, y la determinación de la concentración proteica se realiza mediante la prueba del ácido bicinonínico (BCA, Protein assay reagent, Pierce Chemical Company, USA).

- **Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs):** Las células mononucleares de sangre periférica se aíslan a partir de 2 ml de sangre periférica recogida en un tubo de 10 ml de sangre heparinizada. Posteriormente, la sangre se mezcla con 2 ml de PBS y las células se tratan con un buffer de lisis eritrocitario ACK (0.15M NH₄Cl, 1.0mM KHCO₃, 0.1mM Na₂ EDTA, pH 7.4) lavándose posteriormente dos veces en PBS (phosphate-buffered saline). Las PMBC se suplementan con suero fetal bovino (inactivado mediante calor) al 10%, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 2 mM de Lglutamina, 50 µM de 2-mercaptoethanol, y 1 mM piruvato de sodio. 100µl de PBMCs se colocan en placas con 96 pocillos y son estimuladas con 100µl de 10 µg/ml phytohaemagglutinin type M (PHAM) (Sigma-Aldrich, USA), o con SLA (10 µg/ml). Se mantienen almacenadas durante 5 días en un lugar humidificado al 5%, con CO₂ atmosférico a 37°C. La proliferación celular se mide con la incorporación de bromodeoxiuridina utilizando el Cell Proliferation Biotrak ELISA kit (General Electric Healthcare Life Sciences, UK).

El precipitado obtenido de PBMCs se resuspende en 5 ml de medio ACK (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2) y se incuba durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se añade PBS hasta un volumen aproximado de 50 ml y se centrifuga a 800g durante 10 minutos a 4°C. Tras otro lavado con PBS, las células se resuspenden en 5 ml de medio completo, y se toma una muestra de 15 µl para realizar el recuento celular en cámara de Neubauer.

- **Linfoproliferación celular:** Para determinar el aumento de la proliferación celular inducida por la estimulación de un antígeno específico o un mitógeno, empleamos el kit comercial Biotrack (Amersham Biosciences, Reino Unido) que cuantifica la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico. Los ensayos se hicieron por triplicado. Los resultados se muestran como índice de estimulación (SI) para SLA, índice que se calcula dividiendo el resultado de linfoproliferación de la muestra del paciente estimulada con SLA frente al control. El punto de corte o cut-off para considerar una respuesta linfoproliferativa frente a SLA positiva se calculó mediante el área bajo la curva (AUC) de las diferentes curvas ROC (Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) con intervalo de confianza del 95%. Así, para pacientes asintomáticos se utilizó una curva ROC realizada con los datos de la CPA de 30 pacientes expuestos a *Leishmania* asintomáticos, frente a 60 negativos, siendo el punto de corte 1.972 +/-10% con un 100% de sensibilidad y especificidad. Se consideró por tanto que la respuesta menor o igual a 1.773 es negativa, 1.774-2.168 dudosa e igual o mayor de 2.169 positiva. Para los pacientes sintomáticos, en los casos de LV el cut-off para respuesta positiva es mayor o igual a 2.53 y en los casos de LC fue mayor o igual a 2.26. En los casos de LM se utilizó el cut-off de LV.

Se midió asimismo la expresión de interferón gamma en 50 µl de los sobrenadantes de las PBMCs estimuladas. Para ello se utilizó el kit CBA Human Soluble Protein Flex Set Capture Bead siguiendo las instrucciones del fabricante BD (Becton Dickinson, BD España). Los

resultados obtenidos mediante citometría de flujo fueron analizados utilizando el programa Fcap Array (versión 3.0.1). Los datos se expresan en pg/ml, encontrándose el límite de detección de la técnica en 10 pg/ml. Para los casos de enfermedad visceral la positividad se ha fijado en 133.4 pg/ml y para las formas cutáneas en 314.1 pg/ml. Para las formas mucosas se ha utilizado el cut-off de las cutáneas.

3.5 Análisis estadístico

Todos los datos enumerados previamente se recogieron en una base de datos que se analizó mediante la aplicación estadística SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Las variables cualitativas se han caracterizado mediante la distribución de sus frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas son ofrecidas a través de su media o mediana \pm desviación estándar (DE), rango, rango intercuartílico o intervalo de confianza del 95%.

El análisis estadístico se detalla en cada objetivo. Se ha fijado un valor de $p < 0.05$ como nivel de significación estadística.

3.6 Financiación

Este trabajo recibió apoyo económico de Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) (RD12/0018/0008; RD16/0027/0017) (ISCIII) y fondos FEDER.



3.7 Conflictos de interés

La autora declara no presentar ningún conflicto de interés en relación a este trabajo.

3.8 Consentimiento informado

A todos los potenciales participantes en el estudio se les informó de forma escrita y verbal, entregándose una hoja informativa (ANEXO I) y solicitándose su consentimiento para participar en el mismo. El tratamiento de la información clínica de los pacientes se ajustó a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario de Fuenlabrada en octubre de 2013.

4 RESULTADOS

4.1 Objetivo 1

Estimar la prevalencia de exposición a *Leishmania infantum* en pacientes en tratamiento anti-TNF asintomáticos en una zona de alta endemia y estimar el riesgo de estos pacientes en tratamiento anti-TNF, expuestos y asintomáticos, de evolucionar a enfermedad activa

Según datos del Servicio de Farmacia, 435 pacientes han recibido tratamiento con fármacos anti-TNF en algún momento entre el 1 de junio de 2009 y el 31 de diciembre de 2015. Durante este periodo existen pacientes que han cambiado una o más veces de fármaco, habiendo recibido en algún momento etanercept 160, adalimumab 151, infliximab 136, certolizumab 69 y golimumab 46.

En este periodo ha habido 12 casos de leishmaniasis en estos pacientes (4 casos de LV, 8 casos de LC).

Se reclutó una muestra de 104 pacientes asintomáticos (ver Anexo II). En base a las definiciones previamente descritas, se clasificó como expuestos a 46 y como no expuestos a 56. Estos 46 casos se han clasificado como expuestos por el resultado positivo del test de linfoproliferación a SLA (en cuatro casos además tenían serología positiva). Existen 2 casos que no se han podido clasificar definitivamente como expuestos o no (tenían una única determinación de CPA-SLA, en rango dudoso, y el resto de resultados negativos), y se han excluido del análisis. Por tanto, la proporción de individuos expuestos en nuestra muestra es el 45.09%.

Así, de los 423 pacientes “no enfermos” de la cohorte estarían infectados 190 (IC 95% 155-226). El número de pacientes expuestos en la cohorte sería por tanto 190+12: 202

expuestos, lo cual nos da una prevalencia de exposición a *L. infantum* del 46.43% (IC 95% 38.39%-54.71%) en el total de la cohorte de pacientes en tratamiento anti-TNF en nuestra zona. El ratio de infección asintomática/sintomática sería 15:1.

En el grupo de pacientes asintomáticos expuestos se planteó como objetivo estimar el riesgo de desarrollar enfermedad activa. En el tiempo de seguimiento ninguno de estos pacientes ha presentado leishmaniasis visceral ni cutánea. En el objetivo 5 se describe cómo ha sido el seguimiento de estos pacientes en cuanto al resultado del test de linfoproliferación.

4.2 Objetivo 2

Calcular la incidencia acumulada y la tasa de incidencia de leishmaniasis visceral y cutánea en la cohorte de pacientes en tratamiento anti-TNF que viven en la zona del brote

Para el cálculo de la incidencia acumulada y la tasa de incidencia se han usado los datos del Servicio de Farmacia sobre el número de pacientes bajo tratamiento anti-TNF al inicio del brote y durante el mismo, así como la duración de estos tratamientos.

El inicio del periodo de exposición se consideró el 1 de junio de 2009 (declaración del brote) para los pacientes que tomaban tratamiento inmunosupresor previamente, y la fecha de inicio de tratamiento para los que lo iniciaron posteriormente. En ambos casos se extendió hasta el diagnóstico, la retirada del tratamiento o el 31 de diciembre de 2015.

Al inicio del brote el número de pacientes en tratamiento anti-TNF era 104, pero el número total de pacientes que han estado en tratamiento en algún momento hasta el 31 de diciembre de 2015 ha sido 435, lo que es muy ilustrativo del gran auge que han tenido estos tratamientos en estos años, pero dificulta el cálculo de la incidencia acumulada de enfermedad, que estaría entre 0.9% y 3.84% para LV y entre 1.83% y 7.69% para LC.

El periodo de riesgo (suma del tiempo en tratamiento con fármacos anti-TNF de cada paciente) de estos pacientes ha sido de 377 558 días, 1034 pacientes-año. La tasa de incidencia sería por tanto 386.84 casos por 100 000 pacientes-año para LV y 773.69 casos por 100 000 pacientes-año para LC.

En cuanto al riesgo relativo de cada fármaco, aunque el número de casos es pequeño para hacer comparaciones, podemos ver las tasas de incidencia para cada uno en la Tabla 2 (se ha realizado el cálculo para infección sintomática, incluyendo LC y LV).

Tabla 2: Tasa de incidencia de leishmaniasis sintomática por fármacos

	Días de riesgo (años)	Número de casos	Tasa de incidencia (casos/100 000 pac-año)
Adalimumab	107 000 (293.15)	5 LC + 1 LV	2046.73
Certolizumab	26 410 (72.35)		
Etanercept	119 037 (326.12)	2 LV	613.27
Golimumab	22 571 (61.83)	1 LC	1617.33
Infliximab	102 540 (280.93)	2 LC + 1 LV	1067.88
Total días	377 558		

4.3 Objetivo 3

Describir el cuadro clínico y evolución de los pacientes en tratamiento inmunosupresor (corticoesteroides, metotrexato y fármacos anti-TNF) que han desarrollado la enfermedad durante el brote

Entre junio de 2009 y diciembre de 2015 hubo 27 casos de leishmaniasis en pacientes que recibían algún tratamiento inmunosupresor (metotrexato, corticoides o fármacos anti-TNF). En la Tabla 3 se describen sus principales características. De estos casos, 15 fueron leishmaniasis

viscerales, 10 cutáneas y 2 mucosas. La media de edad al diagnóstico fue 57.15 años (DS 13.98) y la mediana 58 años (RIQ 24). El 44.4% (12) de los casos se dio en mujeres. Únicamente 2 casos fueron pacientes de nacionalidad extranjera (procedentes de Cuba y de Nigeria, ambos de raza negra), el resto fueron españoles de raza caucásica. Los pacientes extranjeros llevaban más de 5 años en España y no habían realizado viajes a su país en los 6 meses previos al inicio de síntomas.

Tabla 3: Casos de leishmaniasis. Características generales de los pacientes

<i>Paciente</i>	<i>Sexo/edad</i> (extranjero)	<i>Enfermedad de base</i>	<i>Otra inmunodepresión</i>	<i>Tiempo de tratamiento</i>	<i>CE</i>	<i>Mtx</i>	<i>Anti-TNF</i>	<i>Otros</i>
LV1	M 68	AR		>1 año	CE ↓	Mtx		
LV2	V 50	EII		4 meses	CE ↔			
LV3	V 88	EPOC		>1 año, ciclos	CE ↑			
LV4	V 64	APs		>1 año		Mtx		
LV5	V 40	NIU		>1 año	CE ↔			Aza
LV6	M 54	AR	DM	>1año	CE ↔	Mtx	Eta	
LV7	M 69 (Cuba)	AR	DM	4 meses	CE ↔	Mtx		
LV8	V 54	APs		Mtx >1 año, Eta 10 meses (previo Ada)	CE ↓	Mtx	Eta	
LV9	V 65	EPOC	Enolismo, desnutrición	>1 año, ciclos	CE ↑			
LV10	M 44	EII		>2 años			Inflix	Aza
LV11	M 60	AR		> 1 año		Mtx		IL20
LV12	M 47	EII		16 meses			Ada	
LV13	M 44	Ps		>1 año		Mtx		
LV14	V 72	ACG		>1 año	CE ↑			

Paciente	Sexo/edad (extranjero)	Enfermedad de base	Otra inmunodepresión	Tiempo de tratamiento	CE	Mtx	Anti- TNF	Otros
LV15	V 33 (Nigeria)	NT		5 meses	CE ↑			
LM1	V 65	AR		> 1 año		Mtx		
LM2	M 71	AR		>1 año	CE ↑	Mtx		
LC1	V 31	Ps		>2 años		Mtx	Inflix	
LC2	V 40	AR		14 meses	CE ↓	Mtx	Goli	
LC3	V 44	EII		>2 años			Inflix	Aza
LC4	M 58	AR		>1 año	CE ↔	Mtx		
LC5	M 62	AR		>2 años			Ada	
LC6	M 60	Ps		>2 años		Mtx	Ada	
LC7	V 50	Ps		>2 años			Ada	
LC8	M 75	AR		>2 años	CE ↔		Ada	Leflunomida
LC9	V 75	AR	DM	>2 años	CE ↔	Mtx	Ada	
LC10	V 49	AR		6-12 meses	CE ↓	Mtx		

ACG: arteritis de células gigantes, Ada: adalimumab, AR: artritis reumatoide, APs: artritis psoriásica, Aza: azatioprina, CE: corticosteroides, DM: diabetes mellitus, EII: enfermedad inflamatoria intestinal, EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, Eta: etanercept, Goli: golimumab, IL-20: anticuerpo monoclonal anti-IL-20, Inflix: infliximab, Mtx: metotrexato, NIU: neumonía intersticial usual, NT: Nefritis tubulointersticial, Ps: psoriasis.

Tiempo de tratamiento: Tiempo desde el inicio del tratamiento inmunosupresor al inicio de síntomas. Corticoides: ↑Dosis altas (>30mg/día), ↓Bajas (<5mg de prednisona al día), ↔Medias (5-10 mg de prednisona al día).

Los pacientes presentaban como enfermedades de base artritis reumatoide (44.4%, 12 pacientes), enfermedad inflamatoria intestinal (14.8%, 4), psoriasis (14.8%, 4), EPOC (7.4%, 2), artritis psoriásica (7.4%, 2), neumonía intersticial usual (3.7%, 1), arteritis de células gigantes (3.7%, 1) y nefritis tubulointersticial por AINEs (antiinflamatorios no esteroideos, 3.7%, 1). Tres

pacientes presentaban diabetes tipo 2 como factor de inmunosupresión adicional, y un paciente presentaba enolismo crónico y desnutrición.

6 de los pacientes (22.2%) recibían tratamiento con corticoesteroides, 4 (14.8%) metotrexato y 5 (18.5%) tratamiento anti-TNF. El resto recibían tratamiento combinado: 5 (18.5%) recibían corticoides y metotrexato; 2 (7.4%) metotrexato y un fármaco anti-TNF; 1 (3.7%) corticoides y un fármaco anti-TNF y 4 (14.8%) tratamiento con corticoides, metotrexato y un fármaco anti-TNF. Entre los 12 pacientes que recibían fármacos anti-TNF solos o en combinación, 6 recibían adalimumab, 3 infliximab, 2 etanercept y uno golimumab. La inmensa mayoría de los casos (81.4% (22)) llevaban con dicho tratamiento más de un año al inicio de los síntomas. 4 pacientes recibían otros tratamientos inmunosupresores de forma concomitante: en tres casos azatioprina, en uno leflunomida y en otro un ensayo clínico con un anticuerpo monoclonal anti-IL-20. En cuanto a las dosis de corticoides, 4 pacientes (25% de los 16 pacientes en tratamiento con corticoides solos o en combinación) tomaban una dosis baja (menos de 5mg de prednisona o equivalente al día), 7 pacientes (43.75%) una dosis media (5-10mg de prednisona o equivalente al día) y 5 pacientes (31.25%) una dosis alta (30mg/día o más).

En la Figura 7 se puede ver la evolución del brote en cuanto a número de casos. El mayor pico de incidencia se dio entre 2011 y 2014, aunque en 2015 se diagnosticaron aún dos casos.

En cuanto a los meses de diagnóstico (Figura 8), las LC se diagnosticaron de forma predominante en los meses de primavera-verano (tres en junio, tres en agosto, una en septiembre, una en marzo y una en abril, una en enero) y las LV en los meses de otoño-invierno (tres en noviembre, cuatro en enero, una en octubre, una en febrero, una en marzo, una en abril, una en mayo, dos en junio, una en agosto). Ambas LM se diagnosticaron en julio.

Figura 7: Distribución de los casos de enfermedad por año de diagnóstico

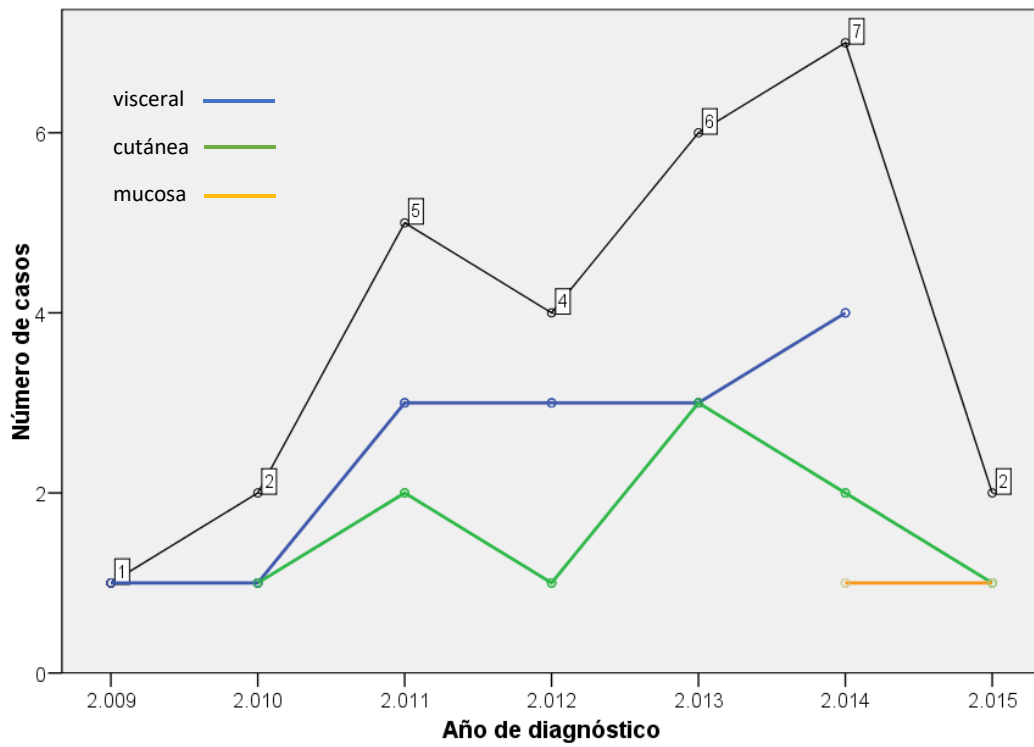
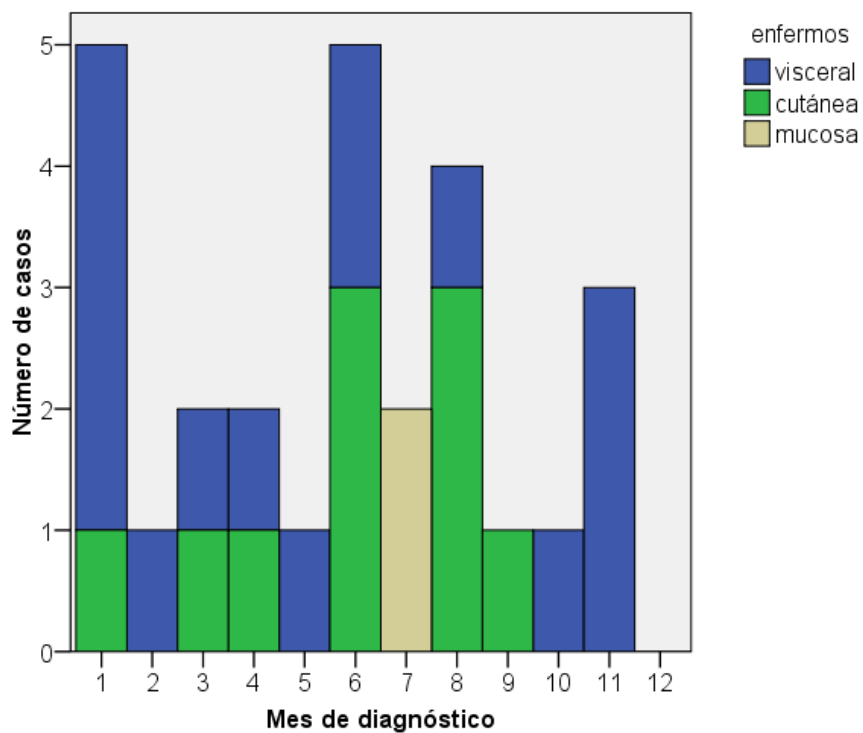


Figura 8: Distribución de los casos de leishmaniasis por mes de diagnóstico



La distancia media de la vivienda de los pacientes al parque Bosque Sur, situado al norte de Fuenlabrada y que se considera el foco del brote, fue 1120 metros (DS 1081.57, mediana 840 metros, RIQ 740). En la Figura 9 se muestra la localización de las viviendas de los pacientes y el parque.

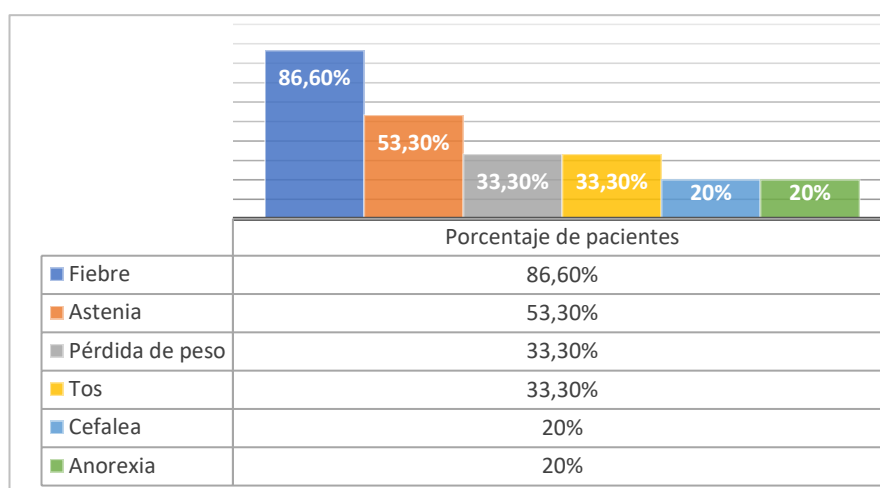
Figura 9: Localización de las viviendas de pacientes enfermos



4.3.1 Leishmaniasis visceral

Los casos de leishmaniasis visceral se describen en detalle en la Tabla 4. Los síntomas más frecuentes presentados por los pacientes al ingreso se enumeran con sus frecuencias en la Figura 10. Otros síntomas en frecuencia decreciente fueron rinorrea o diarrea (en ambos casos presentados por dos pacientes, 13.3%), y síncope, deterioro del estado general, lumbalgia, dolor torácico, dolor en miembros inferiores, linfadenitis, dolor abdominal u odinofagia, cada uno de ellos presentes en un caso (6.6%).

Figura 10: Casos de LV: síntomas más frecuentes



10 pacientes (66.6%) presentaron esplenomegalia a la evaluación clínica o ecográfica.

Todos los pacientes presentaban pancitopenia e hiperferritinemia (salvo un paciente en el que no se solicitó la determinación de ferritina). La cifra media de ferritina fue 5826 ng/ml (DS 11119.76) y la mediana 2605 ng/ml (RIQ 4640.5). Otros reactantes de fase aguda se elevaron de manera discreta: La cifra media de PCR fue 9.3 g/dl y la mediana 8.6g/dl (DS 7.17, RIQ 11.1). El 40% de los pacientes tuvo PCR por encima de 10 g/dl. La cifra media de VSE (determinación obtenida únicamente en 10 pacientes) fue 60.8 (mediana 56.5, DS 36.8, RIQ 42.25).

Tabla 4: Casos de leishmaniasis visceral. Características clínicas

	Clinica	Bazo	Análítica	Test serológicos positivos	Test parasitológicos positivos	IS antes de tratamiento	Tratamiento	Profilaxis	IS tras tratamiento	Status / Tiempo de seguimiento
LV1	Fiebre, astenia, anorexia, pérdida peso	x	Panцитopenia Ferritina 5369	ELISA	PCR MO	Suspende Mtx, Mantiene CE	3 mg/kg/d 10 días	No	Reanuda Mtx 3 meses después	Curado 88 meses
LV2	Fiebre, tos, odinofagia		Panцитopenia Ferritina ND	ELISA	PCR MO	Mantiene CE	4 mg/kg/d 10 días	No	SC	Curado 83 meses
LV3	DEG, astenia, anorexia.	x	Panцитopenia Ferritina 6449	ELISA	Aspirado, cultivo, PCR MO	Suspende CE (fin indicación)	3 mg/kg/d 10 días	No	SC	Curado 80 meses
LV4	Fiebre, astenia, tos, rinorrea, lumbalgia	x	Panцитopenia Ferritina 3514	ELISA	PCR MO	Suspende Mtx (hepatopatía)	4 mg/kg/d 10 días	No	SC	Curado 73 meses
LV5	Fiebre		Panцитopenia Ferritina 1146	rK39 ELISA	Aspirado, PCR MO	Mantiene CE y Azatioprina	4 mg/kg/d 10 días	Dosis mensual 5 meses	SC	Curado 67 meses
LV6	Fiebre, dolor torácico, síncope	x	Panцитopenia Ferritina 7263	rK39 ELISA	Aspirado, cultivo y PCR MO	Suspende Eta, Mantiene CE y Mtx	3 mg/kg/d 7 días	Dosis mensual 18 meses	SC	Recidiva subclínica Exitus
LV7	Fiebre, rinorrea, cefalea		Panцитopenia Ferritina 3356	rK39 ELISA	Aspirado, PCR MO	Suspende CE y Mtx	4 mg/kg/d 10 días	No	Reanuda Mtx 7 meses después	Curado 61 meses
LV8	Fiebre, cefalea		Panцитopenia Ferritina 1851	rK39 ELISA	PCR MO	Suspende CE, Mtx y Eta	4 mg/kg/d 10 días	Dosis cada 3 semanas 6 meses	Reanuda Eta y Mtx 2 meses después	Curado 40 meses

	Clinica	Bazo	Análítica	Test serológicos positivos	Test parasitológicos positivos	IS antes de tratamiento	Tratamiento	Profilaxis	IS tras tratamiento	Status / Tiempo de seguimiento
LV9	Fiebre, astenia, pérdida de peso.	x	Panцитopenia Ferritina 1425	rK39 ELISA	Aspirado, PCR MO PCR sangre	Suspende CE (fin indicación)	3mg/kg/d 10 días	No	SC	Recaída Exitus
LV10	Astenia, diarrea	x	Panцитopenia Ferritina 556	rK39 ELISA	PCR MO PCR sangre	Ya suspendidos Inflix y Azatioprina	3mg/kg/d 7 días	No	SC	Curado 54 meses
LV11	Fiebre, pérdida de peso, tos.	x	Panцитopenia Ferritina 507	rK39 ELISA	Aspirado, PCR MO PCR sangre	Suspende Mtx y anti- IL20	4mg/kg/d 10 días	No	Reanuda Mtx 5 meses después	Curado 47 meses
LV12	Fiebre, astenia, tos, diarrea (Crohn)	x	Panцитopenia Ferritina 374	ELISA	PCR MO	Suspende Ada	3mg/kg/d 7 días	No	Reanuda Ada 3 meses después	Curado 47 meses
LV13	Fiebre, astenia, anorexia, pérdida de peso, tos, linfadenitis reactiva.	x	Panцитopenia Ferritina 1854	ELISA	PCR MO PCR sangre	Suspende Mtx	4mg/kg/d 10 días	No	Reanuda Mtx 2 meses después	Recaída - Retto Curado 45 meses
LV14	Fiebre, astenia, cefalea, síncope, dolor piernas		Panцитopenia Ferritina 43670	ELISA	Aspirado, PCR MO PCR sangre	Mantiene CE	3mg/kg/d 10 días	Dosis mensual 9 meses	SC	Curado 42 meses
LV15	Fiebre, dolor abdominal	x	Panцитopenia Ferritina 4237	ELISA	Aspirado, cultivo y PCR MO	Mantiene CE	Anfotericina B complejo lipídico 2mg/kg/d 10días	1 dosis	Suspende CE	Recaída- Retto Curado 97 meses

Ada: adalimumab, Bazo: Esplenomegalia, CE: corticoesteroides, Inflix: infliximab, MO: médula ósea, Mtx: metotrexato, Retto: retratamiento, SC: sin cambios. El tratamiento es anfotericina B liposomal salvo que se indique lo contrario. Tiempo de seguimiento: desde el diagnóstico hasta el 31 de diciembre de 2017.

En la Tabla 5 se resumen los test diagnósticos realizados y la positividad de cada uno. El diagnóstico se realizó fundamentalmente mediante serología ELISA y PCR en médula ósea, ambas pruebas fueron positivas en el 100% de los pacientes. La serología rápida basada en la detección de anticuerpos frente al antígeno rk39 fue positiva en 8 de los 13 casos en los que se realizó (61.5%).

Tabla 5: Casos de leishmaniasis visceral: Resultados de los test diagnósticos (determinaciones positivas/realizadas)

Serología rK39	8/13 (61.5%)
Serología ELISA	15/15 (100%)
Aspirado médula ósea	8/15 (53.33%)
PCR en médula ósea	15/15 (100%)
PCR en sangre	5/6 (83.33%)
Cultivo médula ósea	3/5 (60%)

Respecto al retraso diagnóstico (días desde el inicio de síntomas al inicio de tratamiento), hubo una paciente con un retraso muy importante: LV10, que presentaba pancitopenia y esplenomegalia desde una consulta realizada 330 días antes del diagnóstico, sin documentarse fiebre en ningún momento. Para el resto de casos, la media de retraso fue de 30.21 días (mediana 21), con una desviación típica de 23.81 y un rango intercuartílico de 50.25.

El tratamiento fue en 14 casos con anfotericina B liposomal a dosis de 3-4mg/kg/día: en 3 casos con 7 dosis (recomendación de la OMS para población general) y en 11 casos con 10 dosis (recomendación para VIH). Un paciente se trató con anfotericina B complejo lipídico 2mg/kg/día 10 días.

La actitud en cuanto al mantenimiento del tratamiento inmunosupresor fue suspenderlo en 5 casos, mantenerlo en 4 casos y suspender parte del tratamiento en 2 casos. En 4 casos el tratamiento se suspendió por otra causa (fin de la indicación/toxicidad hepática). En la mayoría de los casos en que la enfermedad provocó la suspensión de algún tratamiento, se reintrodujo tras la curación clínica (ver Tabla 4).

Se realizó profilaxis secundaria en 5 pacientes (dosis mensual o cada tres semanas), manteniéndose entre 1 y 18 meses a criterio clínico de sus médicos responsables. En el caso de LV5, por ejemplo, se mantuvo hasta que se pudo retirar la azatioprina, y en un caso (LV14) se utilizó el seguimiento del resultado de CPA-SLA que explicaremos más adelante (para retirar la profilaxis al positivar la respuesta).

Tabla 6: Casos de recidiva de leishmaniasis visceral

<i>Paciente</i>	Tiempo desde tratamiento / profilaxis	Síntomas/analítica	Inmunosupresores	Diagnóstico	Tratamiento/Evolución
LV6	2 años / 9 meses	Insuficiencia cardiaca Pancitopenia	CE + Mtx (no se retiraron durante primer episodio)	PCR MO	<i>Exitus</i> : ICC
LV9	1 año / no profilaxis	Reagudización de EPOC	CE (reintroducidos 1 mes antes)	Clínico	<i>Exitus</i> : desnutrición severa
LV13	8 meses / no profilaxis	Astenia Adenopatía cervical	Mtx (reintroducido 6 meses antes)	PCR biopsia adenopatía	ABL 4mg/kg/d 10 dosis Se mantiene mtx
LV15	2 meses / 1 mes	Fiebre, dolor abdominal, pérdida de peso, esplenomegalia, bicitopenia, ferritina 1818 ng/ml	CE (no se retiraron durante primer episodio)	Clínico	ABL 4mg/kg/d 13 dosis Se suspenden CE (fin indicación)

ABL: Anfotericina B liposomal, CE: Corticoesteroides, ICC: Insuficiencia cardiaca congestiva, MO: médula ósea, Mtx: metotrexato.

Hubo 4 pacientes con recidiva clínica o fracaso de tratamiento (Tabla 6):

- Una paciente (LV 13) que había sido tratado con 10 dosis de anfotericina B, suspendiéndose su inmunosupresor (metotrexato) y reiniciándose éste 2 meses después

del tratamiento, presentó 8 meses después del mismo una adenopatía cervical, sin otros síntomas acompañantes y sin alteraciones analíticas. Las pruebas diagnósticas para *Leishmania* en sangre fueron negativas, siendo positiva la PCR en biopsia de la adenopatía. Fue tratada con la misma pauta, sin suspenderse el metotrexato y sin nuevas recidivas.

- El paciente LV15 se trata de un paciente que ya había presentado un episodio de leishmaniasis previo (fuera del periodo de estudio) y que fue tratado en esta ocasión con anfotericina B complejo lipídico y una dosis de recuerdo, manteniéndose el tratamiento inmunosupresor (corticoides). Dos meses después del tratamiento presentó de nuevo la misma sintomatología y alteraciones analíticas, y se consideró fracaso del tratamiento, administrándose 13 dosis de 4mg/kg de anfotericina B liposomal (52 mg/kg dosis total), con un esquema de cinco dosis diarias y el resto semanales, y una dosis más un mes después. En este paciente se suspendió el tratamiento inmunosupresor por haber finalizado su indicación, sin nuevas recidivas.
- El paciente LV9 presentó una recidiva un año después del tratamiento, siendo *exitus* en probable relación con su estado de desnutrición severa. El paciente estaba laringectomizado desde hacía años por carcinoma de laringe y tenía escasa ingesta, problemas deglutorios con frecuentes microaspiraciones y múltiples agudizaciones de EPOC. Se diagnosticó de recaída en base a la sospecha clínica y persistencia de serología muy positiva (ELISA positivo, rK39 positivo, IFI 1/160), aunque la PCR en sangre fue negativa.
- La paciente LV6 tuvo una sospecha de recidiva dos años después del primer episodio (9 meses después de retirar la profilaxis secundaria). Esta paciente estaba en tratamiento inmunosupresor inicialmente con corticoides, metotrexato y etanercept. Al tratamiento de la leishmaniasis se suspendieron el metotrexato y el etanercept, reintroduciéndose el metotrexato posteriormente. Durante el seguimiento presentó pancitopenia, y se retiró

el metotrexato con lo que mejoró ésta, pero presentaba también serología positiva y CPA-SLA negativo, así como PCR en médula ósea positiva. Finalmente fue *exitus* en relación a otras comorbilidades (valvulopatía e insuficiencia cardíaca).

El resto de pacientes no han tenido nuevos episodios. La media del tiempo de seguimiento desde el diagnóstico de los casos de LV (excluyendo los fallecidos) es 64.85 meses (DS 18.07, mediana 61 meses, rango 42-97).

El 33% de los pacientes presentó durante el tratamiento elevación de creatinina por encima de 1.5 mg/dl como efecto secundario, aunque no fue necesario suspender el tratamiento en ningún caso, normalizándose la función renal posteriormente.

4.3.2 Leishmaniasis cutánea

Los casos de LC (Tabla 7) se presentaron como lesiones tipo pápulas, placas o nódulos, múltiples en el 60% de los casos, en zonas fotoexpuestas (extremidades generalmente). El diagnóstico se realizó en todos los casos mediante PCR para *Leishmania* en biopsia de la lesión, siendo el hallazgo histológico más frecuente dermatitis granulomatosa no necrotizante (90%), visualizándose los parásitos únicamente en 3 casos (30%) con las tinciones habituales. En un caso el hallazgo fue dermatitis granulomatosa con necrosis, abscesificación focal y células gigantes multinucleadas tipo Touton.

El tratamiento inicial fue local (antimoniales pentavalentes intralesionales) en 9 casos (90%), todos salvo uno que presentó curación espontánea. En un único paciente (LC7) hubo fracaso del tratamiento precisando tratamiento sistémico (anfotericina B liposomal 3mg/kg/d 7 dosis). Un paciente (LC1) presentó varias recaídas, siendo tratado tras la primera con terapia sistémica. En estos dos pacientes se suspendió el tratamiento de base transitoriamente hasta la curación (en LC1 dos meses después del tratamiento, previo a la recaída y por otros motivos; y

en LC7 tras la primera recaída). En el resto de pacientes no se suspendió el tratamiento de base y no han presentado recaídas (seguimiento: media 58.9 meses, DS 18.93, mediana 53, rango 30-90).

Tabla 7: Casos de leishmaniasis cutánea

	Lesiones	Dx	Tratamiento	Actitud tratamiento inmunosupresor
LC1	Placas abdomen y miembros inferiores	Bx (L, PCR)	Local Recaída +3 meses: ABL 9mg/kg (suspendido por nefrotoxicidad) 2ª recaída +2 meses: 15 mg/kg.	Se mantiene. Se suspende dos meses después, previo a recaída.
LC2	Placa única en brazo	Bx (L, PCR)	Local	Se mantiene
LC3	Nódulo en muslo	Bx (PCR)	Local	Se mantiene
LC4	Pápula en antebrazo	Bx (L, PCR)	Local	Se mantiene
LC5	Varias pápulas en pierna y antebrazo	Bx (PCR)	Sin tratamiento	Se mantiene
LC6	2 lesiones papulonodulares en piernas	Bx (PCR)	Local	Se mantiene
LC7	3 pápulas/placas pantorrilla y muslos	Bx (PCR)	Local (fracaso) 2º ABL 21 mg/kg	Se mantiene, luego se suspende para tratamiento sistémico.
LC8	Lesión costrosa oreja	Bx (PCR)	Local	Se mantiene
LC9	Múltiples lesiones papuloeritematosas faciales y retroauriculares	Bx (PCR)	Local	Se mantiene
LC10	Múltiples pápulas en pierna y hombro	Bx (PCR)	Local	Se mantiene

ABL Anfotericina B liposomal, Bx: Biopsia, Dx: Diagnóstico, L: visualización de *Leishmania*, PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

4.3.3 Leishmaniasis mucosa

Los casos de LM se describen individualmente por su escaso número y su especial interés.

El primero (LM1) es un varón de 65 años diagnosticado de artritis reumatoide, en tratamiento de larga duración con metotrexato, al que se diagnostica de leishmaniasis mucosa en una biopsia de mucosa nasal solicitada en el estudio de una hipertrofia de cornetes. No presentaba ningún otro síntoma ni alteraciones analíticas. La serología rK39 fue positiva y el ELISA negativo. Se trató con 7 dosis de anfotericina B liposomal 3mg/kg/d, suspendiéndose el metotrexato inicialmente, reintroduciéndose tres meses después del tratamiento. No ha vuelto a presentar síntomas (seguimiento 41 meses).

El otro paciente (LM2) es una mujer de 71 años, diagnosticada asimismo de artritis reumatoide, en tratamiento crónico de años de duración con metotrexato y corticosteroides. La paciente refería una ronquera de al menos dos años de evolución, con diagnóstico de laringitis granulomatosa en una biopsia realizada en otro centro. Se había tratado con corticoides sin respuesta, con edema progresivo de aritenoides y cuerdas vocales, que obstruye de forma progresiva la luz de la laringe y que obligó incluso a realizar traqueostomía. En este contexto se opta por repetir biopsia de aritenoides con visualización de *Leishmania*. No presentaba otros síntomas ni alteraciones analíticas, pero sí fueron positivos los resultados del test rápido y la serología (ELISA 0.167, IFI 1/80). Esta paciente se trató con 7 dosis de 3mg/kg/d y 3 dosis de recuerdo (cada 3 semanas), manteniéndose el tratamiento de su enfermedad de base sin cambios, suspendiéndose los corticoides 2 meses después. No ha vuelto a presentar síntomas (seguimiento 29 meses), habiéndose objetivado remisión importante del edema laríngeo, con cierre de la traqueostomía y resolución de la disfonía.

4.4 Objetivo 4

Determinar los factores de riesgo para la exposición a *Leishmania* y para el desarrollo de enfermedad en pacientes en tratamiento anti-TNF

Dado que ningún paciente de la cohorte de pacientes asintomáticos ha desarrollado enfermedad activa durante el seguimiento, se ha realizado un análisis comparativo de los pacientes en tratamiento con un fármaco anti-TNF que han tenido un episodio visceral, mucoso o cutáneo durante el brote (descritos en el Objetivo 3) con los pacientes asintomáticos clasificados como expuestos (grupo control) para determinar los posibles factores de riesgo para enfermedad activa.

Asimismo, se ha realizado una comparativa de los expuestos (asintomáticos o enfermos en tratamiento anti-TNF) con los no expuestos para analizar los posibles factores de riesgo para exposición al parásito.

El análisis estadístico realizado se encuentra descrito en Material y Métodos.

En el análisis univariante de los pacientes expuestos vs. no expuestos (Tabla 8) encontramos asociación significativa entre exposición y edad con el estadístico T de Student ($p=0.018$, diferencia de medias -5.71 . Test de Wald $p=0.021$ OR 1.037^3 IC 95% $1.006-1.069$), aunque al dicotomizar la variable en menores vs. mayores de 55 años pierde significación estadística ($p=0.059$, OR 0.46 IC 95% $0.204-1.038$). El análisis del resto de variables no resulta estadísticamente significativo. En el análisis multivariante con las variables edad, distancia al parque y sexo se mantiene la significación estadística para la edad ($p=0.015$, OR 1.04^* IC 95% $1.008-1.073$).

³ OR promedio para cada cambio unitario en la variable independiente, esto es, riesgo de ser expuesto que tiene un paciente de una determinada edad comparado con un paciente que tiene un año menos, asumiendo que este riesgo es constante para cada par de valores de edad considerados, al menos en el rango explorado en el estudio.

Tabla 8: Análisis univariado: Expuestos vs. no expuestos

Variables independientes		Expuestos frecuencia (porcentaje)	No expuestos frecuencia (porcentaje)	Error alfa	OR (IC95%)
Sexo	Masculino	28 (48.3%)	27 (48.2%)	p=0.995	
	Femenino	30 (51.7%)	29 (51.8%)		
		Expuestos (media +/- SD)	No expuestos (media +/- SD)		
Edad (años) *		52.57 +/- 13.21	46.86 +/-12.07	p=0.018	1.037 (1.006- 1.069)
		Expuestos (Mediana, suma de rangos)	No expuestos (mediana, suma de rangos)		
Distancia del domicilio al parque (metros) **		1050, 2761	1070, 2804	p=0.758	

*Se ha comprobado la distribución normal de la variable y la homogeneidad de varianzas

**Se han excluido los pacientes que no viven en el municipio de Fuenlabrada

Para la variable enfermos/expuestos asintomáticos (Tabla 9), se encuentra asociación estadísticamente significativa con el uso concomitante de corticoides ($p=0.006$, OR 8.2 IC 95% 1.89-35.44) o metotrexato ($p=0.018$, OR 5.57 IC 95% 1.39-22.33), así como el diagnóstico de espondilitis anquilosante que presenta menor riesgo de enfermedad que el resto de enfermedades de base ($p=0.028$, OR incalculable). El análisis del resto de variables no muestra diferencias significativas, aunque la distancia al parque y el uso de adalimumab vs. el resto de tratamientos se encuentran en el límite de la significación estadística ($p=0.052$ y $p=0.051$ respectivamente).

Tabla 9: Análisis univariado Enfermos vs. Expuestos asintomáticos

Variables independientes		Enfermos frecuencia (porcentaje)	Expuestos asintomáticos frecuencia (porcentaje)	Error alfa	OR (IC95%)
Sexo	Masculino	6 (50%)	22 (47.8%)	p=0.893	
	Femenino	6 (50%)	24 (52.2%)		
Nacionalidad	Española	12 (100%)	43 (93.5%)	p=1	
	Extranjera	0	3 (6.5%)		
Diagnóstico p=0.222	AR	5 (41.7%)	10 (21.7%)	p=0.160	incalculable
	Psoriasis	3 (25%)	6 (13%)	p=0.308	
	APs	1 (8.3%)	6 (13%)	p=0.656	
	EA	0	14 (30.4%)	p=0.028	
	EII	3 (25%)	8 (17.4%)	p=0.549	
Fármaco p=0.280	Infliximab	3 (25%)	8 (17.4%)	p=0.549	3.6 (0.95-13.62)
	Adalimumab	6 (50%)	10 (21.7%)	p=0.051	
	Certolizumab	0	9 (19.6%)	p=0.096	
	Golimumab	1 (8.3%)	8 (17.4%)	p=0.440	
	Etanercept	2 (16.7%)	10 (21.7%)	p=0.699	
Uso de corticoides	Si	6 (50%)	5 (10.9%)	p=0.006	8.2 (1.89-35.44)
	No	6 (50%)	41 (89.1%)		
Uso de metotrexato	Si	6 (50%)	7 (15.2%)	p=0.018	5.57 (1.39-22.33)
	No	6 (50%)	39 (84.8%)		
Otra inmunodepresión*	Si	2 (16.7%)	12 (26.1%)	p=0.497	
	No	10 (83.3%)	34 (73.9%)		
		Enfermos (media +/- SD)	Expuestos asintomáticos (media +/- SD)		
Edad (años) **		53.92 +/- 13.44	52.22 +/- 13.28	p=0.695	
		Enfermos (Mediana, suma de rangos)	Expuestos asintomáticos (mediana, suma de rangos)		
Distancia del domicilio al parque (metros) ***		770, 208.5	1190, 1222.5	p=0.052	

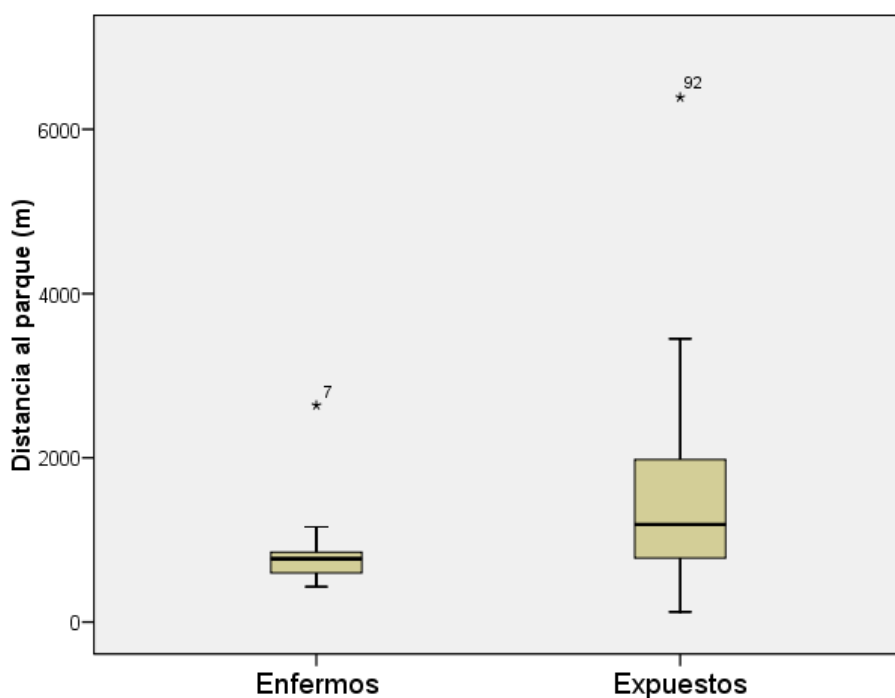
*Otra inmunodepresión: DM, enolismo, trasplante de órgano sólido, esplenectomía

**Se ha comprobado la distribución normal de la variable y la homogeneidad de varianzas

***Se han excluido los pacientes que no viven en el municipio de Fuenlabrada

En el análisis multivariante se ha realizado un modelo de regresión logística binaria con las siguientes variables: edad dicotómica (<55/>55), sexo, uso de corticoides, uso de metotrexato, uso de certolizumab, uso de adalimumab, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide y distancia al parque dicotómica (<1km/>1km), manteniendo la significación estadística el uso de corticoides ($p=0.038$ OR 14.70 IC 95% 1.16-200), de adalimumab ($p=0.028$, OR 21.27 IC 95% 1.39-333.33) y la distancia al parque ($p=0.016$, OR 22.72 IC 95% 1.79-250), no así la espondilitis anquilosante ni el uso de metotrexato. Ambas variables muestran asociación estadísticamente significativa con el uso de corticoides (para EA $p=0.004$, para metotrexato $p<0.001$).

Figura 11: Distancia al parque en enfermos vs. expuestos asintomáticos



4.5 Objetivo 5

Validar la utilidad del test de linfoproliferación a SLA en el manejo de los pacientes en tratamiento inmunosupresor

4.5.1 Resultados en los pacientes enfermos

El test de linfoproliferación se realizó tras la curación en 24 pacientes y al diagnóstico en 9 pacientes. Disponemos también de esta determinación en tres de las recidivas de LV.

4.5.1.1 *Leishmaniasis visceral*

Los resultados de los test realizados en los casos de LV se pueden ver en la Tabla 10. En el episodio activo de leishmaniasis visceral 5 de los pacientes muestran respuesta negativa y 1 respuesta positiva.

Tras la curación de una LV la mayoría de los pacientes positivizan rápidamente la respuesta. En algunos pacientes se han solicitado determinaciones múltiples a lo largo del seguimiento, por diferentes criterios clínicos (respuesta negativa inicial, paciente en profilaxis, sospecha de recidiva, etc.), viéndose que, aunque lo más frecuente es que se mantenga positiva, es posible que la respuesta cambie con el tiempo. Así, en los tres pacientes en que el seguimiento analítico ha sido más prolongado (LV8, LV13, LV14), aunque positivizan la respuesta durante el primer año, posteriormente negativizan y vuelven a positivizar la respuesta durante los años posteriores al tratamiento, sin que haya cambios en el tratamiento inmunosupresor que puedan justificarlos, y sin datos de recidiva. Además, en el caso de LV14, no positivizó respuesta tras la curación clínica hasta 8 meses después, momento hasta el cual se mantuvo la profilaxis secundaria.

Durante las recidivas todos los pacientes presentaron CPA-SLA negativo (determinación realizada en LV6, LV9, LV13).

Tabla 10: Resultados de CPA-SLA en los casos de leishmaniasis visceral

	CPA-SLA enfermo	Tiempo tras tratamiento	CPA-SLA curado	Inmunosupresores curado
LV1	/	3 años	7.23	Mtx + CE
LV2	/	2 años	2.72	Mercaptopurina, enema CE.
LV3	/	4 años	5.37	No
LV4	/	2 años	3.79	Mtx
LV5	/	10 meses	5.24	No
LV6	/	11 meses >1 año	14.99 (profilaxis) 1.1 RECIDIVA	CE CE (Mtx reciente)
LV7	/	1.5 año 2 años 4 años	9.98 6.20 2.97	Mtx
LV8	/	3 meses 8 meses 1 año 1 año 4m 1 año 10 m 2 años 2 años 5m 2 años 9m 3 años 3m 3 años 8m 4 años 8m	2.8 (profilaxis) 6.48 2.09 2.24 4.8 6.9 1.5 1.14 3.4 1.19 2.29	Eta + Mtx Eta + Mtx + CE
LV9	0.76	2 meses 8 meses 1 año	5.70 8.24 1.29 RECIDIVA	Ciclos de CE recientes
LV10	1.02	7 meses 2 años	3.64 5.08	CE Aza + Influx
LV11	0.86	3 meses 7 meses 1 año	6.91 7.11 5.69	Mtx
LV12	3.61	1 mes 4 meses 8 meses	4.65 6.42 5.08	Ada
LV13	1.11	2 meses 8 meses 10m 1año 1 m 1 año 6 m 2 años 2 años 6 m 2 años 10 m 3 años 3 años 6 m	3.39 1.12 RECIDIVA 6.02 10.57 3.31 2.34 1.2 1.85 3.86 2.29	Mtx
LV14	2.52	1 mes 3 mes 6 meses 8 meses 10 meses 1 año 1 año 3 m 2 años 3 m 2 años 7 m 2 años 9 m 3 años 4 m	1.17 (profilaxis) 1.094 (profilaxis) 1.644 (profilaxis) 3.22 2.25 2.64 2.3 2.84 1.33 4.94 1.05	CE
LV15	/	4 años	8.80	No

CPA-SLA >=2.53 POSITIVO <2.53 NEGATIVO

Los resultados del resto de test parasitológicos y serológicos realizados a los pacientes curados se pueden ver en la Tabla 11. Todos los pacientes tenían tanto cultivo como qPCR negativa en sangre, y la serología en la mayor parte de los casos persistía positiva a títulos medios-altos, aunque cambia con el tiempo y negativiza en algunos casos. La determinación de INF-gamma se realizó en 8 pacientes curados, siendo en 7 de ellos positiva.

Tabla 11: Resumen de resultados de los test parasitológicos, serológicos e INF-gamma en pacientes curados de LV

	<i>Cultivo</i>	<i>qPCR</i>	<i>rK39</i>	<i>IFAT</i>	<i>ELISA</i>	<i>CPA-SLA</i>	<i>INF-γ</i>
LV1	-	-	+	1/320	0.4	+	NR
LV2	-	-	+	1/80	1.41	+	NR
LV3	-	-	-	<1/40	0.002	+	-
LV4	-	-	-	1/160	1.20	+	+
LV5	-	-	+	1/80	0.64	+	+
LV6	-	-	+	1/40	0.7	+	+
Recaída	-	-	+	1/160	0.487	-	NR
LV7	-	-	+/-	1/160-1/80	0.761-0.39	+	NR
LV8	-	-	+/-*	1/80-<1/40*	0.2-0.02*	+/-	NR
LV9	-	-	+	1/320-1/160	2.9	+	+
Recaída	-	-	+	1/160	2.69	-	NR
LV10	-	-	+/-	1/160-1/80-1/40	0.479-0.136	+	+
LV11	-	-	+	1/160-1/320	1.7-2.32	+	+
LV12	-	-	+	<1/40	0.05	+	NR
LV13	-	-	+/-	1/160-1/40	0.194-0.05	+/-	+
Recaída	-	-	+	1/40	0.03	-	NR
LV14	-	-	+	<1/40	0.26-0.14	-/+	NR
LV15	-	-	-	1/160	0.22	+	NR

NR: no realizado. En los pacientes que tienen varias analíticas a lo largo del seguimiento, se muestran los diferentes resultados. ELISA ≥ 0.170 positivo, IFAT $\geq 1/80$ positivo. *solo en la primera analítica tiene serología positiva.

En las recaídas puede verse tanto un aumento en el título de anticuerpos (LV6) como que se mantengan similares a los resultados previos (LV9) o incluso en el caso de LV13 que la serología sea negativa. En ninguna de ellas positivizó la PCR o el cultivo.

4.5.1.2 *Leishmaniasis cutánea*

Como vemos en la Tabla 12 en el único paciente en que se realizó la determinación durante la enfermedad activa (LC7), la respuesta fue negativa, al igual que tras el fracaso del tratamiento local, positivizando tras el tratamiento sistémico. Tras el tratamiento, incluyendo a este paciente, la respuesta fue positiva en 5 casos de los 7 a los que se realizó la determinación (71.42%). En uno de ellos (LC2) fue inicialmente negativa (1 mes tras el tratamiento), positivizando posteriormente y manteniéndose positiva en los controles ulteriores. En otro de ellos (LC1) negativizó en un control 2 años después (5 años post-tratamiento).

Tabla 12: Resultados de CPA-SLA en los casos de leishmaniasis cutánea (No disponemos de datos de LC8, LC9, LC10)

Paciente	CPA-SLA enfermo	Tiempo tras tratamiento	CPA-SLA curado	Inmunosupresores curado
LC1	/	3 años 5 años	3.95 0.78	Eta + Mtx
LC2	/	1 mes 7 meses 1 año	1.13 3.60 3.48	Goli + Mx + CE Abatacept
LC3	/	1 mes	4.29	Inflix + Aza
LC4	/	3 años	0.97	Leflunomida, Mtx, CE
LC5	/	5 años	7.80	Mtx + CE
LC6	/	4 años	1.90	Ada + Mtx
LC7	2.21	Previo a tratamiento sistémico 5 meses	1.65 6.33	Ada No

CPA-SLA ≥ 2.26 POSITIVO < 2.26 NEGATIVO

El resto de test parasitológicos y serológicos en estos pacientes han sido todos negativos en todas las analíticas en pacientes curados y también en el episodio activo de LC7. Se realizó

determinación de INF-gamma en los pacientes LC2, LC4, LC6 y LC7 (curados), siendo positivos todos salvo LC4.

4.5.1.3 *Leishmaniasis mucosa*

Los resultados han sido muy irregulares (Tabla 13) tanto antes como después del tratamiento y en el seguimiento posterior. El paciente LM1 presentó CPA-SLA positivo al diagnóstico y negativo en todos los controles sucesivos, tanto sin metotrexato como tras reintroducir éste. En el paciente LM2 el CPA-SLA durante el episodio fue negativo, manteniéndose así tras el tratamiento hasta el sexto mes en que positivizó para volver a negativizar y positivizar posteriormente.

Tabla 13: Resultados de CPA-SLA en los casos de leishmaniasis mucosa

Paciente	CPA-SLA enfermo	Tiempo tras tratamiento	CPA-SLA curado	Inmunosupresores curado
LM1	3.3	2 meses	1.5	No
		7 meses	1.9	Mtx
		10 meses	1.6	
		1 año 5m	0.9	
LM2	0.899	1 mes	1.5	CE y Mtx
		3 meses	1.08	
		6 meses	5.73	Mtx
		10 meses	1.34	
		1 año 2m	3.780	
		1 año 7m	2.525	
		1 año 10 m	1.907	

CPA-SLA ≥ 2.53 POSITIVO < 2.53 NEGATIVO (se ha usado el cut-off para LV)

La determinación de INF-gamma ha sido positiva en LM1 (tanto enfermo como curado) y negativa en LM2 (tanto enfermo como curado). Los test parasitológicos han sido negativos en ambas y la serología ha sido negativa en LM1 y positiva en LM2.

Tabla 14: Resumen de resultados de los test parasitológicos, serológicos e INF-gamma en pacientes curados de LM

	Cultivo	qPCR	rK39	IFAT	ELISA	CPA-SLA	IFN- γ
LM1	-	-	+/-	1/40	-	-	+
LM2	-	-	+	1/160-1/80	+/-	+/-	-

4.5.1.4 Posibles marcadores de curación en pacientes inmunosuprimidos

En la Tabla 15 se pueden ver los resultados de los diferentes test parasitológicos, serológicos y marcadores de inmunidad celular (CPA-SLA e INF-gamma) en las formas activa y curada de las diferentes formas clínicas, en nuestra cohorte de pacientes inmunosuprimidos.

El pequeño número de casos cutáneos y mucosos, así como sus resultados irregulares, no permiten extraer conclusiones sobre los posibles test de curación en estas formas clínicas. En la forma visceral, fueron significativas las diferencias para la PCR (50% vs. 0%, $p=0.015$) y la linfoproliferación a SLA (16.6% vs. 100%, $p<0.001$) así como el interferón gamma (16.6% vs. 87.5%, $p=0.026$), que es en la única en que podemos calcular el OR: 35 (IC 95% 1.743-702.99). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a rK39 ($p=0.684$), IFAT ($p=0.550$) ni ELISA ($p=0.184$).

Tabla 15: Determinaciones positivas/realizadas de los test parasitológicos, serológicos y de inmunidad celular antes y después de tratamiento (paciente con enfermedad activa-paciente curado)

	LV		LC		LM	
	Activos	Curados	Activos	Curados	Activos	Curados
PCR (%)	3/6 (50%)	0/15 (0%)*	0/1 (0%)	0/7 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
Rk39 (%)	5/6 (83.3%)	12/15 (80%)	0/1 (0%)	0/7 (0%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
IFAT (%)	5/6 (83.3%)	11/15 (73.3%)	0/1 (0%)	0/7 (0%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)
ELISA (%)	4/6 (66.6%)	14/15 (93.3%)	0/1 (0%)	0/7 (0%)	0/2 (50%)	1/2 (50%)
CPA-SLA (%)	1/6 (16.6%)	15/15 (100%)*	0/1 (0%)	5/7 (71,42%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
INF-gamma (%)	1/6 (16.6%)	7/8 (87.5%)*	/	3/4 (75%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)

* $p<0.05$

4.5.2 Resultados en la muestra de pacientes asintomáticos

En nuestra muestra de 104 pacientes en tratamiento con fármacos anti-TNF, se han identificado mediante el test de linfoproliferación 46 pacientes con exposición a *L. infantum*. De éstos, únicamente 4 tenían serología positiva (Tabla 16) y ninguno de ellos presentaba cultivo o

qPCR en sangre positiva. Dos pacientes fueron excluidos del análisis por resultados en rango dudoso (Se considera determinación válida la que no está en rango dudoso. Todos los resultados en rango dudoso de serología o CPA-SLA se han descartado para el análisis, y estos dos pacientes tenían únicamente resultados en rango dudoso). 56 pacientes tienen todas las determinaciones válidas negativas (11 de ellos solo tienen una determinación).

Al realizar determinaciones seriadas de este test durante un año, de acuerdo al plan descrito en Material y Métodos, hemos visto que los resultados varían con el tiempo en una alta proporción de pacientes. En el cuadro 1 se puede ver un resumen de los resultados obtenidos.

En 14 pacientes de los clasificados como expuestos, los resultados no son discordantes (todos los resultados válidos son positivos, 4 de ellos de forma obligada porque solo tienen una determinación), mientras que 32 pacientes cambian su positividad a lo largo del seguimiento.

Del subgrupo de pacientes que se reclutó antes del inicio del tratamiento anti-TNF (“inicios”, 29 pacientes), 12 eran expuestos según el resultado de la analítica pre-tratamiento. Al iniciar el tratamiento, 8 de ellos perdieron la respuesta, 2 mantuvieron la positividad y 2 negativizaron para volver a positivizarla posteriormente.

En los pacientes que ya recibían tratamiento al ser reclutados (“antiguos”) que tuvieron la primera analítica positiva (19 pacientes), 8 mantuvieron la positividad a lo largo del tiempo, mientras que 5 la perdieron y 2 la perdieron para luego volver a recuperarla. 4 pacientes tienen una única analítica válida.

Cuadro 1: Resultados del test CPA-SLA en la cohorte de pacientes asintomáticos

Pacientes no expuestos: 56 (todas las determinaciones válidas negativas)

Pacientes expuestos: 46

No discordantes: 14 (todas las determinaciones válidas positivas) 2 inicios y 12 antiguos. Ver tabla 17

Discordantes: 32

- Pierden respuesta al iniciar el tratamiento: 8

Fármaco(s)	Pre-tto	+2 meses	+6 meses	+12 meses	Cambios de tratamiento
Eta	+	-	-		
Goli	+	-	-	-	
Eta + CE	+	-	-*		*Cambio a cierto
Certo	+	-	-		
Certo	+	-	-		
Goli	+	+	-	-	
Certo	+	-	-*		*Suspendido
Eta + CE + Mtx	+	+/-	-		

- Pierden respuesta sin cambios en el tratamiento: 5

Fármaco(s)	0 meses	+6 meses	+12 meses
Certo	+	-	+/-
Goli	+	-	+/-
Goli	+	-	+/-
Ada + Mtx	+	-	-
Goli	+	+	-

- Ganan respuesta: 8

Fármaco(s)	Pre-tto	+2 meses	+6 meses	+12 meses	Cambios de tratamiento
Eta	-	+/-	+		
Certo	-	-	+		*Suspendido
Certo	-	+	+	+	
Certo	-	-	+	+	
		0	+6	+12	
Inflix		-	+		
Inflix		-	-	+	
Inflix		-	+	+	
Inflix		-	+	+/-	

- Cambian el sentido de la respuesta más de una vez: 11

Fármaco(s)	Pre-tto	+2 meses	+6 meses	+12 meses	extra	Cambios de tratamiento
Eta	+	-	+	-		
Certo	-	+	+/-	-		
Ada	-	+	-	-		
Inflix	+	-	+			*Cambio a abatacept
Goli	-	-	+	-*		*Cambio a eta
		0	+6	+12		
Eta		+	-	+	-	
Goli		-	+	-*		*Cambio a cierto
Ada		-	+	-**		*Cambio a goli **suspendido
Ada		+	-	+	-	
Ada		+	-	+		
Inflix		-	-	+	-	

Cada línea representa un paciente. +/-: resultado en rango dudoso. Ada: adalimumab, CE: corticoesteroides, Certo: certolizumab, Eta: etanercept, Goli: golimumab, Inflix: infliximab, Mtx: metotrexato, Pre-tto: pre-tratamiento.

De los pacientes tanto antiguos como nuevos que tenían una primera determinación negativa, 15 positizaron posteriormente (7 inicios, 8 antiguos), posiblemente por exponerse durante ese periodo (aunque no se puede descartar que la(s) determinación(es) anterior(es) fuera(n) un falso negativo). De estos, 7 volvieron a negativizar en una analítica posterior.

Como se puede ver en el cuadro, una alta proporción de pacientes ha tenido cambios de tratamiento durante el seguimiento, lo que dificulta aún más el análisis de estos datos y podría explicar en algunas ocasiones los cambios en el resultado del test.

Tabla 16: Pacientes asintomáticos con serología positiva

	Pre-tratamiento		+2/0		+6		+12	
	Serología	CPA-SLA	Serología	CPA-SLA	Serología	CPA-SLA	Serología	CPA-SLA
1	-	+	-	+	Rk+ IFAT 1/80 ELISA 0.351	+	-	+
2	Rk- IFAT 1/80 ELISA -	+	Rk - IFAT 1/160 ELISA -	+	Rk -, IFAT 1/80 ELISA -	+	Rk- IFAT 1/80 ELISA -	+
3			-	+	Rk- IFAT <1/40 ELISA 0.4	-	-	+
4			Rk - IFAT 1/40 ELISA 0.17	-	Rk - IFAT <1/40 ELISA 0.339	+	Rk - IFAT 1/80 ELISA 0.58	+

En todos los casos qPCR y cultivo fueron negativos. ELISA ≥ 0.170 positivo IFAT $\geq 1/80$ positivo

1: Golimumab (+12 cambia a cierto) 2: etanercept, corticoides, metotrexato (+6, +12 suspende etanercept) 3: Adalimumab 4: Infliximab

En la Tabla 17 se pueden ver los resultados del grupo de pacientes que mantiene la positividad en todas las determinaciones durante el seguimiento (expuestos no discordantes, 4 de ellos (28.5%) tienen una única determinación válida). En algunos de estos casos hay también cambios de tratamiento durante ese periodo.

Tabla 17: Resultados de pacientes expuestos no discordantes (todas las determinaciones válidas positivas)

Fármaco(s)	Pre-tto	+2 meses	+6 meses	+12 meses	Cambios de tratamiento
Goli	+	+	+	+	*cambio a Certo
Eta + CE + Mtx	+	+	+	+	*Suspendido Eta
		0	+6	+12	
Inflix + Mtx		+	+	+	
Eta + CE		+	+	+	Cambio a Ada
Ada		+	+	+	
Inflix		+	+		
Eta + Mtx		+	+/-	+	
Ada + Mtx		+	+		
Eta		+	+	+	
Ada		+	+	+/-	
Ada		+			
Eta + CE + Mtx		+			
Ada		+			
Certo		+	+/-		

Ada: adalimumab, CE: corticoides, Certo: certolizumab, Eta: etanercept, Goli: golimumab, Inflix: infliximab, Mtx: metotrexato.

A lo largo del seguimiento ningún paciente de la cohorte ha presentado datos clínicos o analíticos de enfermedad activa (tiempo medio de seguimiento 44.93 meses, rango 31-52), por lo que al igual que no hemos podido analizar el riesgo de progresión a enfermedad activa en estos pacientes, tampoco sus posibles predictores.

5 DISCUSIÓN

5.1 Prevalencia de infección asintomática en pacientes en tratamiento anti-TNF

La prevalencia de infección asintomática estimada en nuestra cohorte ha sido mucho mayor de la esperada. En el diseño del estudio estimamos una prevalencia de 15% dado que fue la que encontramos en población VIH (15.4% (184)), pero el resultado ha sido mayor del 40%. Esta cifra es similar a la encontrada en zonas endémicas, no en zonas de brote relativamente reciente como es la nuestra. Sin embargo, como explicábamos en la Introducción, se ha sugerido (7) que la población de Fuenlabrada no hubiera tenido contacto previo con *Leishmania*, dado el perfil epidemiológico del brote (que ha afectado mayoritariamente a adultos inmunocompetentes).

En las últimas décadas, y en parte motivado por la preocupación de que los sujetos asintomáticos puedan ser infectivos (por medio del vector o por donación de sangre), se han realizado múltiples estudios sobre la prevalencia de exposición a *Leishmania* en zonas endémicas y el mejor test para detectarlo.

En un estudio de seroprevalencia (164) en más de 600 donantes de sangre en Murcia se detectó PCR positiva en el 8% de los individuos y ELISA positivo en el 2%. En otro estudio en donantes de Ibiza (186) se obtuvieron las siguientes positividades: ELISA 2.4%, Western blot 7.6%, PCR 22.1%, cultivo 4.5%, test de leishmanina 22.3%. 12 meses después en 18 de los individuos que fueron positivos se repitió la PCR siendo aún positivos la mitad.

En un estudio en Alicante (44) a finales de los años 90, aproximadamente el 10% de los niños y el 50% de adultos tuvieron un test de leishmanina positivo, y en el 20% de ellos se detectó parasitemia.

En cuanto a inmunosuprimidos, en un estudio reciente (169) sobre infección subclínica realizado en el norte de Italia (una zona no endémica históricamente, en la que ha habido un número creciente de casos en los últimos años), comparando pacientes con enfermedades reumatológicas en tratamiento con fármacos biológicos con dos grupos control (pacientes en tratamiento con inmunosupresores clásicos e individuos sanos), encontraron una prevalencia del 36% en su muestra de pacientes en tratamiento con fármacos biológicos, significativamente mayor que en el grupo de controles sanos (no encontraron positividad en ningún paciente del segundo grupo). En este estudio el cribado se realiza mediante qPCR en células mononucleares de sangre periférica, que, de acuerdo a los autores, tiene mayor sensibilidad que la prueba en sangre completa, que es la más habitual y la que se utiliza en nuestro estudio, lo que podría justificar que no haya sido positiva en ninguno de nuestros sujetos.

En el contexto del brote de Fuenlabrada se realizó un estudio mediante la determinación de diferentes parámetros de respuesta inmune (CPA-SLA y citoquinas) para determinar la prevalencia de exposición a *Leishmania* en receptores de un trasplante de órgano sólido, encontrándose una prevalencia del 21% de infección asintomática en esta población (174). Se realizó asimismo un estudio en población general mediante 257 muestras del banco de sangre del Hospital (datos no publicados) encontrándose una prevalencia del 19%.

El criterio fundamental en nuestro estudio para clasificar a los pacientes como expuestos ha sido el resultado del CPA-SLA. Dado que se han realizado múltiples determinaciones a cada paciente, hemos podido comprobar que existe una importante variación del resultado de esta prueba con el tiempo, tanto en pacientes presumiblemente expuestos como en pacientes curados (estos sí, expuestos con certeza). Por todo esto, es posible que la técnica tenga un número elevado de falsos negativos. Además, dado que hemos

descartado todos los resultados en rango dudoso, consideramos que estaríamos infraestimando la prevalencia de exposición a *Leishmania* en nuestra población.

En cualquier caso, y a falta de un *gold standard* para el cribado de infección asintomática, el test de linfoproliferación tendría mucha mayor sensibilidad que la serología dado que ésta identificó únicamente a 4 de los pacientes de la muestra, y también que la PCR, que no fue positiva en ninguno. Por supuesto, la ausencia de un *gold standard* también hace que desconozcamos la sensibilidad y especificidad de las distintas pruebas y no tengamos forma de saber qué individuos asintomáticos están realmente infectados; por tanto, es posible que exista también un número no desdeñable de falsos positivos.

Pese a todo, y dado que en cualquier prueba de cribaje lo más importante es una alta sensibilidad, consideramos que este test supondría una mejora en la detección de infección asintomática con respecto a las pruebas usadas hasta ahora. Como ilustran los ejemplos previos, en la mayoría de estudios al respecto es preciso utilizar varios test simultáneamente para aumentar la sensibilidad (177,187). Entre las pruebas serológicas, parece que es el Western blot el que tendría mayor sensibilidad (186), y de todos los test utilizados sería el test de leishmanina, que conlleva como ya señalamos en la Introducción varias dificultades para su uso (necesidad de citar al paciente de nuevo para ver el resultado, ausencia de comercialización del reactivo en Europa, uso limitado en sujetos inmunosuprimidos). La correlación entre los resultados del test de leishmanina y la respuesta linfoproliferativa a SLA es alta (188), y de hecho algunos estudios utilizan el test CPA-SLA como *gold standard* para valorar la sensibilidad y especificidad de otras pruebas (182).

En cuanto al riesgo de los pacientes con exposición asintomática de desarrollar enfermedad activa, un estudio (168) en dos zonas de alta endemicidad de la India, que realiza un cribado de infección asintomática usando PCR y serología rk39 detectó una prevalencia de

98/1000, y en estos pacientes el seguimiento evidenció un ratio de conversión a enfermedad activa de 23.1 por 100 personas en un año. Otros estudios similares en Brasil e India (citados por (168)) encuentran cifras de conversión también elevadas (3.48-45%) pero son en su mayoría estudios en contactos de pacientes enfermos y no en la población general. En nuestro trabajo, dado que ninguno de los pacientes considerados expuestos ha desarrollado enfermedad activa durante el periodo de estudio, no hemos podido estimar el riesgo, pero parece en cualquier caso bajo (46 pacientes expuestos seguidos durante una media de 44.93 meses). En nuestro medio no existe que nosotros conozcamos ningún estudio que valore este riesgo, y tampoco hay ningún estudio específico en población inmunosuprimida no VIH.

5.2 Incidencia de enfermedad en pacientes en tratamiento anti-TNF

Hemos obtenido una tasa de incidencia de 386.84 casos por 100 000 pacientes-año para LV y 773.69 casos por 100 000 pacientes-año para LC.

Las tasas de incidencia en España más elevadas en los últimos años (sin tener en cuenta el brote de Fuenlabrada) se han encontrado en Baleares (tasas de 4.72 y 4.59 casos por 100 000 habitantes en 2005 y 2006)(10). Las cifras de Madrid en los años previos al brote eran de 0.59/100 000 habitantes (2006), y durante el brote la tasa de incidencia (periodo 2009-2014) ha sido de 20.32/100 000 habitantes, 7.77/100 000 para LV y 12.87/100 000 para LC (189). Vemos por tanto una incidencia más de 50 veces superior en población inmunosuprimida por fármacos anti-TNF que en la población general. Las cifras en cuanto a formas viscerales son similares a las encontradas en población VIH (tasa de incidencia de LV 413.4 casos/100 000 habitantes (184)).

Con respecto a las diferentes formas clínicas, parece claro que uno de los principales determinantes de ésta es el estatus inmune del paciente. El estudio molecular del parásito en el brote no ha encontrado una relación entre genotipo del mismo y forma clínica (30). El ratio

enfermedad cutánea/visceral en nuestros pacientes ha sido sin embargo 2:1, similar al de la población general en el brote (1.6:1 (189)). Esto va en contra de los datos recogidos en la literatura que sugieren un predominio de formas viscerales en esta población (123), aunque hay que tener en cuenta el infradiagnóstico habitual de las formas cutáneas, que tal vez en el contexto de un brote como este haya sido menor por establecerse un bajo umbral de sospecha, mayor tendencia de los pacientes a consultar, etc. En cualquier caso, nuestros datos apoyarían la hipótesis de que la alteración de la inmunidad de estos pacientes no es tan severa como para no poder establecer una respuesta adecuada que impida la visceralización. En la población VIH del brote, sin embargo, sí se vio un claro predominio de formas viscerales (7:1), y las formas cutáneas se dieron en pacientes con buena situación inmunológica (184). También en el global de la población inmunosuprimida farmacológicamente (corticoides, metotrexato o anti-TNF), como vemos en el Objetivo 3, ha habido predominio de formas viscerales.

En relación al ratio infección sintomática/asintomática encontrado en nuestro estudio (1:15), no disponemos de datos en la literatura sobre población inmunosuprimida con los que compararlo. En el estudio de Alicante (44), en población general, encuentran un ratio de 1:50. Como comentábamos en la Introducción, en estudios en otros países se han visto ratios muy dispares (en Brasil 1:18 (190), en Etiopía 1:5.6 (45)). Aunque ya hemos visto que medir de forma veraz y reproducible la prevalencia de infección asintomática es difícil, existen otros factores que explican la disparidad de cifras encontradas, entre ellos el estatus socioeconómico, el estado nutricional y factores genéticos (187).

Por fármacos, la tasa de incidencia más alta se ha encontrado para adalimumab, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el objetivo 4. Excluyendo a certolizumab, que no ha tenido ningún caso, la tasa más baja de enfermedad ha sido la de etanercept. Sin embargo, los dos casos que se han dado con este tratamiento han sido formas viscerales, mientras que los

otros fármacos han tenido predominio de formas cutáneas, por lo que realmente sería el fármaco que tendría la tasa de incidencia de LV más alta. Volveremos sobre este tema más adelante en la discusión de los factores de riesgo de enfermedad.

5.3 Características de los casos de leishmaniasis en pacientes inmunosuprimidos

En la serie de 27 casos que presentamos encontramos, como ya hemos comentado, un predominio de formas viscerales (55.5%). Hay también sin embargo un número no despreciable de formas cutáneas, y dos formas mucosas, muy poco habituales en nuestro medio. Encontramos muy pocos adultos jóvenes (solo dos pacientes menores de 40 años), y solo dos pacientes son de origen extranjero, al contrario que en la población general del brote donde se encontraba un número muy elevado de individuos de origen subsahariano (189).

Hay un número discretamente mayor de pacientes varones, patrón que se repite, y de forma más acusada, en múltiples estudios epidemiológicos tanto para *Leishmania* como para otras infecciones por parásitos, y que encontramos en nuestro brote tanto en población general (189) como en pacientes VIH (184). Esto se ha asociado con diferencias de género en el comportamiento y estilo de vida que llevarían a diferente exposición (con más importancia probablemente en países empobrecidos que en nuestro medio) y también con el efecto inmunomodulador de las hormonas sexuales, ya que existe evidencia experimental de que los andrógenos y la progesterona interferirían con la función de los macrófagos haciendo a los hombres más susceptibles a este tipo de infecciones (191–193). En cualquier caso, en nuestra serie la diferencia por género no es tan llamativa, tal vez debido a que algunas de las enfermedades de base de los pacientes son más frecuentes en mujeres (por ejemplo la AR, que representa casi la mitad de los pacientes de nuestra serie y que afecta cuatro veces más a mujeres que a hombres (194)).

Se trata de un grupo heterogéneo en cuanto a los diagnósticos de base y las combinaciones de tratamiento inmunosupresor utilizadas. La mayoría de los pacientes llevaban más de un año con el mismo tratamiento, lo que sugiere que se trate de una primoinfección y no la reactivación de una infección latente. El tiempo de tratamiento de los pacientes con fármacos anti-TNF era de más de un año salvo en un caso en que eran 10 meses. Para estos fármacos, como comentábamos en la Introducción, múltiples estudios (83,96,100,101,195) sugieren que el riesgo de infecciones sería máximo en los primeros 3-6 meses de tratamiento, aunque es muy posible que estos resultados estén sesgados (porque a los pacientes que enferman o tienen alto riesgo se les retire el tratamiento y por tanto los que permanecen en el estudio sean más sanos, o que al controlar mejor a medio plazo la enfermedad de base también se reduzca el riesgo de infecciones (97)).

En cuanto a la evolución cronológica, vemos una curva bimodal con un primer pico en 2011, lo que coincide con la evolución del brote en la población general, pero la mayor incidencia se dio en los años 2013 y 2014, con 6 y 7 casos respectivamente, cuando el número de casos del brote habían descendido ya drásticamente (tuvieron un pequeño repunte en el invierno de 2013-14)(189). Una posible explicación para esto sería que los tiempos de incubación en población inmunosuprimida fueran más largos, como han sugerido algunos autores (169). La distribución por meses de los casos también podría dar alguna pista en este sentido dado que la actividad del vector comienza en mayo y se establece un tiempo habitual de incubación de entre 2 y 12 meses, algo más breve en las formas cutáneas. En nuestra serie la distribución es similar en los casos de LV a la de la población general (picos en otoño-invierno), mientras que los casos de LC se han diagnosticado predominantemente en meses de verano, siguiendo los de la población general una distribución parecida a los viscerales.

Vemos como, al igual que en la población general (26), VIH (184) y trasplantados (75), se trata de pacientes que viven muy cerca del parque considerado foco del brote (distancia mediana 840 metros). En el estudio sobre los casos en pacientes trasplantados se estableció que los pacientes que vivían a menos de 1km del parque tenían mayor riesgo de LV que los que vivían a más de 1km (75).

Los casos de LV han presentado las alteraciones clínicas y analíticas típicas de la población general, lo que está de acuerdo con lo descrito en la literatura (196–198). Especial mención refiere la hiperferritinemia encontrada en todos los pacientes en que se realizó la determinación, con cifras muy elevadas difíciles de encontrar en otros procesos agudos. Esto, que ya se había descrito para la población general del brote y para la población VIH, no se encuentra descrito en la literatura en humanos salvo de forma anecdótica (199), y consideramos que tendría un alto valor predictivo positivo en el diagnóstico diferencial de cuadros similares. En un artículo (200) se propone el rápido descenso de ferritina tras tratamiento como un marcador precoz de respuesta terapéutica.

En cuanto al diagnóstico, se ha visto en estos pacientes una altísima sensibilidad de la serología (de acuerdo con otras series de la literatura (196–198), y al contrario de lo que sucede en población VIH (201)), así como de la PCR en médula ósea. El retraso diagnóstico ha sido de menos de un mes, en probable relación como ya hemos comentado con el bajo umbral de sospecha que ha habido en estos años en nuestro centro desde la declaración del brote. En la literatura sin embargo encontramos frecuentemente (76) dificultades para el diagnóstico, siendo habitual que se planteen de entrada diagnósticos alternativos como brotes de la enfermedad de base, enfermedades hematológicas etc.

Durante el periodo de estudio no existían unas recomendaciones claras con respecto a la pauta de tratamiento óptima para estos pacientes, que sí se establecen de forma más

unívoca, como comentábamos en la Introducción, en las últimas guías (OMS (22), IDSA (23)). Por tanto, se realizó a criterio de su médico, y vemos que varios casos se trataron con la dosis de inmunocompetentes, con buena respuesta. Asimismo, pese a que la recomendación predominante en la literatura sobre qué hacer con los inmunosupresores es suspenderlos transitoriamente o al menos bajar la dosis (115,123), vemos como una alta proporción de nuestros casos mantuvieron parte o todo su tratamiento, sin incidencias.

Las recidivas, sin clara relación con la pauta de tratamiento usada ni con el mantenimiento o suspensión de los inmunosupresores, se dieron, salvo en un caso, en pacientes con importantes comorbilidades o muy inmunosuprimidos, y los dos pacientes que fallecieron lo hicieron también probablemente por causa de sus comorbilidades. Un segundo ciclo de tratamiento con la misma pauta fue suficiente para retratar a dos de las recaídas, sin nuevas recidivas y sin modificar por este motivo el tratamiento de base de los pacientes.

Los casos de LC presentaron también características similares a los casos de inmunocompetentes del brote (33): lesiones atípicas, frecuentemente múltiples. Si bien muchos de los casos descritos en la literatura, al contrario que los que describimos, suelen presentar formas diseminadas o complicadas, es muy probable que exista un sesgo de publicación. En cuanto al diagnóstico, de nuevo la mayor rentabilidad es de la PCR, dado que únicamente 3 pacientes se diagnosticaron por la visualización del parásito. Esto no es raro dado que la evolución de la lesión conlleva la formación un infiltrado inflamatorio granulomatoso, produciéndose una disminución en el número de amastigotes, lo cual dificulta su identificación (202).

A pesar de tratarse de pacientes inmunosuprimidos (y de nuevo ante la ausencia de evidencia sobre el mejor tratamiento para estos pacientes), la mayoría se trataron con terapia local, solo 2 pacientes precisaron tratamiento sistémico por fracaso o recidiva, habiendo

incluso una curación espontánea. Tampoco fue preciso retirar el tratamiento de base en la mayoría de casos. Los datos sobre el tratamiento de LC por *L. infantum* provienen de series de casos (24), y existe aún menos evidencia sobre inmunosuprimidos. Tampoco se conocen tasas de curación espontánea ni hay datos sobre diferencias en el resultado estético con o sin tratamiento.

Los casos de LM siguen el patrón que encontramos en la literatura (12,203): ambos casos de presentación insidiosa, con síntomas inespecíficos locales de larga duración, llegando al diagnóstico “casualmente” mediante la anatomía patológica, sin otra sintomatología ni alteraciones analíticas, y con serología positiva a títulos bajos.

Existen múltiples incógnitas con respecto a la LM, especialmente en torno a su patogénesis y si se trata del sitio de inoculación o de una extensión secundaria. Ninguno de los dos casos que presentamos tenía historia de lesiones cutáneas que pudieran ser el origen de la enfermedad. En el contexto del brote ha habido sin embargo un caso (204) de un paciente inmunocompetente que ha presentado una leishmaniasis nasal habiendo tenido previamente una LC curada (sería por tanto un caso de enfermedad mucocutánea).

Dada la baja incidencia de leishmaniasis mucosa por *L. infantum* no existe tampoco evidencia en cuanto al tratamiento, que suele ser sistémico (en parte por la posible existencia de otras lesiones no diagnosticadas), aunque se han descrito casos curados con tratamiento local o quirúrgico (12). Nuestros casos se trataron con tratamiento sistémico con anfotericina B liposomal a las dosis usadas para LV en población inmunocompetente, y en una de ellas se mantuvo profilaxis secundaria tras la curación. Ambos tuvieron buena evolución sin recidivas.

Aunque los casos de LM en nuestra serie no están asociados al tratamiento con fármacos anti-TNF, varios estudios experimentales sugieren que estas formas serían más frecuentes en esta población. En un estudio (205) en ratones knockout para el receptor 1 del

TNF, tras la infección por *L. major* conseguían controlar el parásito pero no resolver las lesiones, viéndose un perfil de respuesta inmune similar al encontrado en las formas mucocutáneas de enfermedad. Asimismo, los polimorfismos en las secuencias promotoras del TNF-alfa se han asociado con LM (8). Existen varios casos descritos en la literatura de formas mucosas o mucocutáneas con estos fármacos (13,122,127,150).

Al diseñar el estudio, dos de las dudas que planteábamos eran si era necesario retirar el tratamiento inmunosupresor y si era necesaria la profilaxis secundaria en estos pacientes. En cuanto a la retirada del tratamiento inmunosupresor, aunque los casos son muy heterogéneos y el número es pequeño, no parece que haya una diferencia en la evolución entre los casos en que se retiró y en los que no. Consideramos que lo más prudente sería suspenderlo inicialmente y reintroducirlo de forma precoz, pero en los casos en que retirarlo pueda suponer un brote de su enfermedad de base, con la alteración inmunitaria que eso puede provocar, sería razonable mantenerlo. En cuanto a la necesidad de profilaxis en los casos de LV, no tenemos tampoco datos concluyentes, pero no parece necesaria para la mayoría de pacientes, pudiendo plantearse en casos en que la inmunosupresión sea severa (varios fármacos, corticoides a dosis altas, etc.). Más adelante comentaremos la posible utilidad del test de linfoproliferación para la toma de decisiones en este contexto.

5.4 Factores de riesgo de exposición a *Leishmania*

Al realizar el análisis univariado comparando la población expuesta y la no expuesta, hemos encontrado diferencias en cuanto a la edad ($p=0.015$, OR 1.04 IC 95% 1.008-1.073 en el análisis multivariado). Está ampliamente descrito en la literatura que la prevalencia de exposición a *Leishmania* aumenta con ésta (206). En un estudio epidemiológico (207) en un foco endémico de leishmaniasis canina en Cerdeña en 1990 la positividad del test de leishmanina presenta una curva hiperbólica, siendo positivo en 39.3% de la población

inmunocompetente entre 55-65 años (en población general 9.7%, varones 15.5%). El estudio de Alicante (44) encuentra también grandes diferencias entre niños y adultos (10%-50%). Aunque, como ya hemos comentado, se ha elucubrado a la vista del perfil etario de enfermedad que la población de Fuenlabrada fuera una población no expuesta con anterioridad al brote (no existen datos de exposición previos en la zona), consideramos que tanto la elevada prevalencia como el gradiente de exposición por edades que encontramos en nuestro estudio, iría en contra de esta teoría, aunque sí es posible que la exposición previa fuera a una cepa diferente con menor virulencia (31). En este sentido, y dado que al diseñar el estudio consideramos que la exposición sería reciente (como máximo desde el inicio del brote), no analizamos el tiempo de residencia en la zona, factor que se ha relacionado con el riesgo de enfermedad en otros estudios (186).

En cualquier caso, el descenso de la incidencia de leishmaniasis infantil ha sido una constante en Europa en la segunda mitad del siglo XX, y se ha asociado fundamentalmente a cambios sociales que dan lugar a una exposición menor a edades tempranas, así como menor susceptibilidad a las infecciones por mejoras nutricionales y del estatus inmune (44).

Un factor que se ha asociado de forma constante a la exposición a *Leishmania* en el Mediterráneo (164,169), pero que en nuestro caso no tiene interés al tratarse de un brote urbano es el hábitat rural, lo que se ha relacionado con factores como el clima, el tipo de suelo, etc.

5.5 Factores de riesgo de enfermedad

En el análisis de la población enferma vs. la expuesta, hemos encontrado diferencias significativas en cuanto al uso concomitante de corticoesteroides o metotrexato y al diagnóstico de espondilitis anquilosante. La distancia al parque y el uso de adalimumab se encuentran en el límite de la significación estadística.

En cuanto a las posibles diferencias de riesgo entre fármacos, como comentábamos en la Introducción, múltiples estudios⁴ atribuyen al etanercept un riesgo de infecciones (83,91–94,143) y de infecciones granulomatosas (100–105) menor que el asociado al resto de fármacos, y también se ha sugerido esta ventaja para *Leishmania* (143). La plausibilidad biológica de esta diferencia está detallada en la Introducción. Nuestros datos, sin embargo, no confirman esta teoría. Por un lado, como comentábamos previamente, es el fármaco que ha presentado mayor tasa de incidencia de formas viscerales, y en el análisis comparativo de expuestos vs. enfermos no hemos encontrado una diferencia significativa de riesgo con los otros fármacos. Algunos de los estudios citados tienen limitaciones metodológicas muy importantes (están basados en los casos publicados o en sistemas de declaración poco fiables, con datos incompletos sobre las características de los pacientes o sobre el uso de estos fármacos en las poblaciones en estudio...).

El único estudio (152) que compara experimentalmente el efecto de estos fármacos en células infectadas por *Leishmania*, como comentábamos en la Introducción, considera que certolizumab sería más seguro que infliximab o adalimumab, dado que éstos, al contrario que certolizumab, disminuyen la proliferación de células T y aumentan el número de macrófagos infectados. Si bien el hecho de que sea el único fármaco que no ha tenido ningún caso en nuestra serie apoyaría esta teoría, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas y tampoco es posible calcular el OR. Las diferencias moleculares entre certolizumab y los otros fármacos son bastante importantes como ya se ha comentado, y se ha propuesto que la pegilación tenga un efecto inmunoestimulador. En ese mismo estudio se analizaba asimismo una forma pegilada de infliximab que también mejoraba la eliminación de *Leishmania*, posiblemente por medio del complemento.

⁴ En las referencias que mencionamos en este apartado, salvo que se especifique lo contrario, se habla siempre del riesgo de infección o infección grave con el uso de fármacos antiTNF, no del riesgo de leishmaniasis dado que no existen apenas estudios al respecto.

Los datos sobre certolizumab en las revisiones sistemáticas sobre el riesgo de infecciones graves son en cualquier caso contradictorios, atribuyéndole tanto el menor riesgo (208) como el mayor riesgo del grupo (85).

El único fármaco que parece asociado a mayor riesgo de enfermedad en nuestro estudio es adalimumab (OR 21.27 IC 95% 1.39-333.33 $p=0.028$ en el análisis multivariado) aunque hay que señalar que la mayoría de los casos con éste fueron formas cutáneas, lo que habla tal vez de una respuesta inmune suficiente para evitar la visceralización. El riesgo con adalimumab e infliximab debería ser muy similar, dado que se trata prácticamente del mismo fármaco: Ambos tienen volúmenes de distribución, vida media y aclaramiento similares, pero al ser subcutáneo adalimumab presenta menor concentración pico (lo que debería en todo caso afectar en menor medida a la respuesta inmune). El hecho de no haber encontrado asociación en nuestro estudio con infliximab puede deberse a varios factores, entre ellos el tamaño de la muestra o la posibilidad de factores de confusión por diferencias en el perfil de paciente (patología, otros tratamientos) con cada uno.

En relación al diagnóstico de base, es conocida la disfunción inmune que presentan los pacientes con AR, por diferentes mecanismos, entre ellos la alteración de la función linfocitaria (98). Además, se trata de una enfermedad que suele llevar asociada una carga elevada de fármacos inmunodepresores, especialmente ciclos de corticoides, al contrario que otras enfermedades de este grupo, como la espondilitis anquilosante. Este ha sido en nuestro estudio el único diagnóstico que ha presentado diferencias significativas, asociándose a un menor riesgo de enfermedad (OR incalculable), que consideramos se encuentra relacionado probablemente con la ausencia de uso de corticoides en esta patología, dado que pierde la significación en el análisis multivariado y hemos encontrado asociación significativa entre ambas variables. Además, se trata habitualmente de un perfil de paciente más joven con menos comorbilidades. En el análisis de los datos del registro Biobadaser (209) comparan el

riesgo de infección grave de los fármacos anti-TNF en pacientes con AR y pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo y encuentran mayor riesgo para los pacientes que no tienen AR. Los autores sugieren que esto podría ser debido a la peor situación basal de estos pacientes (que suelen tener indicaciones de uso compasivo, más tratamientos concomitantes etc.), o a alteraciones de la inmunidad inherentes a sus enfermedades, no bien conocidas.

Otros factores relacionados con el diagnóstico que se han visto asociados al riesgo de infección, y que no hemos podido incorporar en nuestro estudio por no tener acceso fiable a esos datos, son el tiempo de evolución de la enfermedad (209) y el grado de control de ésta, que como decíamos puede condicionar la situación de inmunodepresión de estos pacientes. En un estudio (210) sobre el riesgo de infecciones asociado al uso de adalimumab se encontró una correlación lineal entre el índice de actividad de enfermedad de Crohn y la incidencia de infecciones. También en el estudio de los datos del registro alemán (97) el control de la enfermedad se asocia a menor riesgo de infección. Aunque otros estudios no han confirmado esta asociación, es frecuente que se utilicen variables subrogadas para medir el control de la enfermedad como por ejemplo el uso de corticoides, que podrían ser factores de confusión.

Nuestros resultados sobre el uso de corticoides (OR 8.2 IC 95% 1.89-35.44, $p=0.006$) y metotrexato (OR 5.57 IC 95% 1.39-22.33, $p=0.018$) coinciden con múltiples estudios que hablan de que el riesgo de infección asociado al uso de fármacos anti-TNF es mayor con el uso de corticoesteroides (84,97,98), y mayor a mayor dosis de éstos. La asociación es menos clara con otros fármacos (azatioprina, metotrexato etc.), posiblemente porque su uso se asocie a mejor control de la enfermedad de base. En el análisis multivariado la asociación de enfermedad con el uso de corticoides se mantiene ($p=0.038$ OR 14.70 IC 95% 1.16-200), no así con metotrexato, siendo probablemente un factor de confusión dado que los pacientes que usan este fármaco usan también frecuentemente corticoides ($p<0.001$).

Uno de los resultados inesperados de nuestro estudio ha sido no hallar asociación entre la exposición a *Leishmania* y la distancia entre el domicilio del paciente y el Parque. Esta asociación se ha confirmado en VIH (184) y en pacientes con TOS se ha visto asociación entre la distancia y los casos de LV (75), y resulta plausible dado que la actividad del flebotomo es nocturna y su radio de vuelo en zonas urbanizadas es de unos 300 metros (189). Una de las posibles limitaciones de nuestro análisis es que hemos realizado la determinación de las distancias de forma lineal sin tener en cuenta las posibles barreras verticales en el hipotético recorrido del mosquito. Otra posibilidad, que ya comentábamos y que ampliaremos en el siguiente punto, es que hayamos clasificado como no expuestos a un número relevante de pacientes expuestos, dado que desconocemos la sensibilidad del test CPA-SLA.

En la comparativa enfermos/expuestos sí que hemos encontrado en cambio una asociación entre enfermedad y domicilio a menos de 1 Km del parque (OR 22.72 IC 95% 1.79-250 $p=0.016$ en el análisis multivariado). Es muy posible por tanto que la exposición repetida al parásito aumente el riesgo de desarrollar enfermedad (inóculo mayor, contacto con varias cepas...). No hemos encontrado ningún estudio que compare la exposición al vector (u otras variables subrogadas de exposición al parásito) en infección asintomática y sintomática (existen además pocos estudios en zonas con un foco espacial tan concreto).

Otros factores que se ha descrito que aumentan el riesgo de los fármacos anti-TNF en algunos estudios son la edad (209) (aumenta el riesgo de infección grave (195,209) y de tuberculosis (104)) y la etnicidad no blanca (aumenta el riesgo de tuberculosis (102)). En nuestro estudio y posiblemente debido al número de pacientes no hemos encontrado diferencias significativas para estas variables.

Un factor que parece tener gran relevancia y que resulta muy difícil a día de hoy introducir en este tipo de estudios son las diferencias genéticas, que se sabe que afectan a la

tasa de infección asintomática, y por tanto a la inmunidad contra el parásito. Se han visto algunos genes candidatos (43) en estudios familiares o de casos y controles (IL-4, TNF, IFN γ receptor, IL-10, NRAMP1 (Slc11a1)), pero su impacto concreto es desconocido. Algunos estudios (42,211) dan bastante fuerza a los polimorfismos del gen del TNF, lo que podría determinar no solo el diferente riesgo de leishmaniasis de algunos pacientes, sino diferencias de riesgo en pacientes que usan el mismo fármaco anti-TNF.

Otro factor que no hemos tenido en cuenta y que ha tenido mucha atención en la literatura en los últimos años ha sido el efecto de las diferencias nutricionales en el riesgo de infección por *Leishmania* (170). Aunque no es probable que haya grandes diferencias en cuanto a la nutrición proteica en la mayoría de individuos de nuestra cohorte, sí que puede existir un riesgo de desnutrición en casos concretos (enolismo, neoplasias, etc.) y también se han encontrado alteraciones de la respuesta inmune a *Leishmania* asociadas al déficit de micronutrientes (212).

Vemos como se trata de una población con múltiples factores de inmunodepresión, con una distribución muy heterogénea y cambiante en el tiempo. Diferenciar entre factores de riesgo y factores de confusión en estos pacientes es particularmente difícil y precisaría el estudio de una población muy grande para poder analizar de forma adecuada la asociación entre las diferentes variables y el riesgo atribuible a cada una. Para infecciones más frecuentes esto es algo menos complejo al disponer de más datos, y existe por ejemplo un modelo matemático que permite estimar el riesgo basal de un paciente de tener una neumonía de cara a plantear el inicio de un tratamiento anti-TNF (213). Un modelo similar para leishmaniasis sería de gran utilidad en zonas endémicas.

5.6 Marcadores de curación y recidiva

Para los casos de LV, al analizar los resultados de los diferentes test propuestos como posibles marcadores de curación, antes y después de tratamiento, vemos como las diferencias son significativas para el CPA-SLA, el INF-gamma y la PCR en sangre, que permitirían por tanto distinguir entre enfermedad activa y curada en estos pacientes. El resto de test son poco fiables dado que son positivos o negativos de forma inconstante por los motivos que ya hemos explicado.

La PCR en sangre, si bien parece buen marcador de curación, vemos que no sirve para monitorizar posibles recaídas en esta población (como recomiendan algunos autores (76)), dado que ninguna de las tres muestras de recidiva fue positiva.

En cuanto a la respuesta linfoproliferativa, vemos que es negativa en la mayoría de los pacientes (83.33%) durante la enfermedad activa, como parece lógico dado que si han presentado una forma visceral será porque no han conseguido tener una respuesta inmune suficiente para controlar el parásito. Tras el tratamiento, en la mayoría de pacientes esta respuesta positiviza en los primeros meses, aunque en algunos pacientes tarda más. Este resultado es similar al encontrado en la población general del brote, donde en enfermedad activa mostraron respuesta positiva el 22% de los individuos, aunque con un índice de linfoproliferación bajo, positivizando al tercer mes tras tratamiento en el 93% de los pacientes (189).

Tanto el CPA-SLA como el INF-gamma hablan del control inmunológico del parásito y por tanto su positividad sería marcador de curación y de ausencia de recidiva, mientras que su negativización sería sugestiva de ésta. Mientras que los resultados en población VIH (184), y en pacientes trasplantados (174) fueron muy consistentes en este sentido, vemos que en nuestra muestra la negativización de la respuesta proliferativa no es rara en el seguimiento de

los pacientes curados, sin coincidir necesariamente con una recidiva, si bien todos los pacientes que recidivan negativizan la respuesta (tendría por tanto baja especificidad).

Aunque la utilidad de la respuesta linfoproliferativa en población inmunosuprimida no VIH sería por tanto más limitada, consideramos que sería razonable solicitarla tras el tratamiento, especialmente en casos con dudas sobre la efectividad de éste o bien muy inmunodeprimidos, y seguir estrechamente a los pacientes que no positivizan la respuesta inicialmente. En estos se podría plantear la profilaxis secundaria hasta que lo hicieran (esto confirmaría que son capaces de desarrollar una respuesta inmune al parásito, aunque el hecho de perder la positividad posteriormente no implique necesariamente la recaída ni la necesidad de reanudar la profilaxis). Los pacientes que positivizan respuesta de forma precoz (primeros 3 meses) consideramos que se pueden considerar curados y se puede reintroducir la medicación inmunosupresora en el caso de que se hubiera suspendido, aunque el seguimiento en cualquier caso debe ser estrecho especialmente en el primer año (que es cuando se han dado la inmensa mayoría de las recidivas en el brote).

En algunos casos, el hecho de que la respuesta linfoproliferativa sea negativa tras la curación podría hablar de una posible “cura estéril” que se ha relacionado con la pérdida de la inmunidad al parásito. Así, varios autores (50,214) han sugerido que el mantenimiento de la inmunidad podría requerir la estimulación permanente mediante antígenos latentes. También se ha propuesto que pacientes que abandonan la zona endémica perderían la inmunidad al dejar de exponerse, como sucede en otras enfermedades (181).

En las formas cutáneas y mucosas, la respuesta linfoproliferativa positiva presente en algunos pacientes en la enfermedad activa podría indicar la capacidad del huésped de controlar la infección (evitar su visceralización o incluso presentar curación espontánea, que es frecuente en LC y se ha descrito también en algunos casos de LM (215)), pero no sirve para

diferenciar las formas activa y curada. Aunque es posible que la ausencia de significación estadística en nuestro estudio sea debida al escaso número de pacientes, en la población inmunocompetente (33 casos de LC) tampoco ha sido posible validar un test de curación (datos no publicados).

Varios de los pacientes curados de LC presentaron respuesta negativa. A estos se les realizó la determinación varios años después de la curación, por lo que es posible que hubieran presentado respuesta positiva tras la curación y la hubieran perdido posteriormente. En cualquier caso está descrita en la literatura esta diferencia entre los perfiles inmunológicos de los pacientes curados de LC y LV, que se ha atribuido entre otras causas a que la mayor carga parasitaria en LV daría lugar a una respuesta Th1 más fuerte (181,216). En diferentes estudios con *L. major* se ha asociado la ausencia de proliferación celular y de elevación de INF-gamma con enfermedad cutánea severa y ausencia de curación espontánea (217,218).

5.7 Infección asintomática

Hemos realizado un cribado de infección asintomática por *Leishmania* en una muestra de 104 pacientes asintomáticos en tratamiento con fármacos anti-TNF, a los que hemos realizado qPCR, serología, cultivo y test de linfoproliferación celular CPA-SLA. Hemos identificado 46 pacientes positivos, todos ellos con CPA-SLA positivo, 4 de ellos además con serología positiva. Uno de los hallazgos inesperados, junto con la elevada prevalencia de infección asintomática, ha sido el hecho de que la respuesta linfoproliferativa cambia en muchos pacientes con el tiempo.

Si bien lo más habitual en los pacientes que presentan respuesta positiva antes de iniciar el tratamiento es negativizarla tras éste (83.3%), no podemos estar seguros al atribuir al fármaco ese efecto dado que otros pacientes cambian la positividad sin cambios en el tratamiento. Asimismo, para los pacientes que presentan respuesta negativa y que la

positivizan durante el estudio existen dos opciones: que se hayan expuesto durante el mismo o que se tratara de un falso negativo previo. El número de pacientes y los cambios frecuentes de tratamiento, no permiten extraer conclusiones sobre la relación de estos cambios en la respuesta con los diferentes fármacos.

En los pacientes curados de nuestra serie ya hemos visto que esto ocurría también, no solo que pierdan la respuesta, sino que ésta negativiza y vuelve a positivizar. Una de las posibles causas es la pérdida del estímulo inmune y la reexposición ulterior. En el seguimiento de los pacientes que tuvieron una LV durante el brote (población general) se ha visto que la mayoría de estos mantienen la respuesta positiva al menos 8 meses, lo que se ha atribuido a dos factores: el mantenimiento del contacto con el parásito al vivir en la zona del brote, y el sistema inmune competente del individuo (189). Un estudio que analizaba la evolución de la secreción de INF-gamma en pacientes curados encontró que esta se elevaba en los meses 3 y 6 post-tratamiento, pero al año descendían a un tercio del nivel en el mes 6 (178). Actualmente no se conoce con claridad el tiempo que tarda en desarrollarse una respuesta celular específica efectiva, así como la duración de dicha respuesta en el tiempo (189).

Si bien a los pacientes inmunocompetentes no se les ha realizado un seguimiento tan prolongado como a los pacientes de nuestro estudio, asumimos que gran parte de la variabilidad en la respuesta linfoproliferativa encontrada en los pacientes inmunosuprimidos se debe a una de las características más importantes de nuestra población, que no encontramos en la población inmunocompetente ni en los individuos VIH con buen control: el grado de inmunodepresión en estos pacientes es cambiante. Por un lado, son frecuentes tanto brotes de enfermedad (con la inmunodepresión asociada a éstos) como cambios de dosis o de tratamiento (por múltiples causas: pérdida de efecto, efectos secundarios, etc.). Por otro lado, sabemos que el efecto inmunomodulador de los fármacos anti-TNF es tiempo-dependiente y

de hecho en algunos casos hay que acortar el intervalo de administración por pérdida de efecto transcurridas 1-2 semanas de la dosis. Es posible por tanto que la respuesta linfoproliferativa negativice en relación con la administración del fármaco (momento de máxima inmunodepresión) y sea recuperada según se aclara este. En nuestro estudio no hemos tenido acceso a la información sobre la fecha de administración de la dosis (salvo infliximab, los fármacos se administran en casa por el paciente) y por tanto no hemos podido comprobar esta hipótesis, pero consideramos que sería un dato a considerar en próximos estudios.

Aunque se considera que tanto los pacientes curados como los asintomáticos muestran inmunidad a largo plazo, los perfiles inmunológicos de ambos difieren discretamente, siendo mayor la respuesta linfoproliferativa y la producción de INF-gamma en curados, mientras que la producción de otras CK como la IL-10 sería mayor en asintomáticos (47).

Estas técnicas tienen aún diferentes aspectos a clarificar, como han señalado varios autores. En primer lugar, aunque la sensibilidad parece mayor que la del test de leishmanina, una de las ventajas de éste es que se ha usado ampliamente en múltiples estudios con diferentes poblaciones y estatus clínicos (180). La complejidad de la técnica de linfoproliferación dificulta el estudio de la misma en zonas endémicas y por tanto la validación de su utilidad (180). Los test basados en medición de CK mediante ELISA, que son menos laboriosos y requieren menos equipo que el test de linfoproliferación (178), serían más fáciles de llevar a cabo en países en desarrollo y también más reproducibles entre laboratorios. Se está estudiando la utilidad de otras muchas CK como posibles marcadores (180).

En cuanto a los límites de positividad, estos varían según la población y la técnica utilizada y son difícilmente comparables entre estudios. Diferentes autores han sugerido que

las técnicas realizadas mediante el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica tendrían menor sensibilidad que las realizadas en sangre completa (172,180). Aunque lo habitual en otros estudios es realizar una única determinación por paciente con lo que sería imposible detectar estos cambios, en algunos estudios sí se han hecho varias determinaciones encontrando también variación temporal en los resultados en ambas direcciones, que puede ser debida en parte a la inexactitud en el cálculo de los cut-off (180).

En cuanto al riesgo de progresión a enfermedad activa de estos pacientes expuestos, como comentábamos en el objetivo 1 parece bajo, y en cualquier caso la evolución de la CPA-SLA no permitiría distinguir a pacientes que van a tener enfermedad activa.

En relación al interés de un cribado de infección asintomática previo a la inmunosupresión en pacientes que vivan en zona endémica, que ha sido recomendado por varios autores (212,219), consideramos que no está justificado. En primer lugar, los métodos de cribaje disponibles actualmente son poco fiables y probablemente no clasifican correctamente a una gran parte de la población. En segundo lugar, no parece que el riesgo de reactivación de infección latente sea alto en estos pacientes, y tampoco parece que exista a día de hoy una forma de predecir qué pacientes van a tener enfermedad activa. Se debe mantener en cualquier caso un bajo umbral de sospecha ante la aparición de síntomas en estos pacientes, e incorporar a la educación de los mismos información sobre el parásito, medidas preventivas y síntomas por los que consultar.

5.8 Limitaciones del estudio

Nuestro estudio presenta varias limitaciones:

- En primer lugar, se trata de un estudio observacional, con las limitaciones inherentes a los mismos para analizar causalidad.

- La recogida de datos es retrospectiva, por lo que puede haber alguna inexactitud, y no es ciega, aunque los datos recogidos son objetivos, lo que minimiza el riesgo de sesgo.
- La selección de la muestra de pacientes asintomáticos no fue aleatoria (por diferentes razones, siendo la fundamental que queríamos garantizar un número similar de individuos con cada fármaco y al inicio del estudio había muy pocos pacientes en alguno de los grupos, así como por diferentes limitaciones para el reclutamiento (acceden a participar en el estudio en general los pacientes con mejor situación basal)). Tampoco disponemos de los datos de la cohorte total para poder realizar un test de homogeneidad, ni tenemos acceso a datos de este tipo de pacientes a nivel poblacional. Por tanto, es posible que la muestra esté sesgada y los resultados no sean extrapolables a la cohorte o a otras poblaciones similares.
- Dado que se trata de tratamientos de dispensación hospitalaria, todos los pacientes en tratamiento con estos fármacos están incluidos en el análisis, pero existe la posibilidad de que algún paciente que viva en la zona siga tratamiento en otro centro.
- Por diferentes motivos (el paciente no se realizó todas las analíticas, hubo problemas con la muestra, el resultado fue en rango dudoso) solo el 54% de los pacientes de la cohorte de 104 asintomáticos tiene 3 o más analíticas válidas para la valoración del estatus de exposición (de acuerdo con el protocolo inicial). Esto podría alterar los datos en el sentido de haber infraestimado el número de pacientes expuestos o el número de pacientes que modifican su respuesta con el tiempo.
- Asimismo, en el diseño inicial del estudio de cohortes se asumió que algún paciente resultaría enfermo en el periodo del estudio y no ha sido así. Esto, aunque habla del bajo riesgo de enfermedad activa que tienen estos pacientes, dificulta el análisis riguroso de este riesgo y sus factores.
- Por otro lado, pese a ser la serie de casos más grande publicada en nuestro medio de pacientes inmunosuprimidos de una misma zona endémica, el pequeño número de

casos (especialmente en la forma de leishmaniasis mucosa) hace también que sea menos probable llegar a resultados estadísticamente significativos.

- En cuanto al análisis realizado, dado el pequeño número de casos hemos analizado conjuntamente los casos de leishmaniasis visceral y cutánea, y es posible que ambas formas clínicas tengan factores de riesgo diferentes. Como comentábamos en la Introducción, se ha sugerido que el TNF tenga un papel especialmente relevante en la defensa de piel y tejidos blandos (95).

Pese a todo, consideramos que la metodología y el tamaño del estudio, así como el acceso a la información sobre las características de la población de estudio, datos reales sobre el uso de fármacos, etc. mejoran en gran medida la calidad de los pocos estudios publicados hasta el momento sobre este tema, y por tanto las conclusiones que ofrecemos, si bien deben ser interpretadas y extrapoladas a otras poblaciones con precaución, son de gran interés y podrían ayudar a la toma de decisiones clínicas y de salud pública, y sobre todo al diseño de estudios de mayor envergadura que confirmen nuestras hipótesis. Estos estudios consideramos que deberían ser multicéntricos y probablemente a nivel europeo para alcanzar suficiente potencia estadística.

6 CONCLUSIONES

1. La prevalencia estimada de exposición a *Leishmania* en pacientes en tratamiento anti-TNF en nuestra zona ha sido del 46.43%. Ninguno de los pacientes expuestos en nuestra muestra desarrolló enfermedad activa durante el periodo de estudio.
2. La tasa de incidencia de enfermedad en pacientes en tratamiento anti-TNF en el periodo de junio de 2009 a diciembre de 2015 fue de 386.84 casos por 100 000 pacientes-año para leishmaniasis visceral y de 773.69 casos por 100 000 pacientes-año para leishmaniasis cutánea. Etanercept fue el fármaco que presentó la incidencia más alta de leishmaniasis visceral.
3. El ratio de infección asintomática/sintomática encontrado en nuestra zona fue 15:1.
4. El cribaje de infección asintomática en estos pacientes no está justificado.
5. El cuadro clínico de los casos de leishmaniasis visceral en pacientes inmunosuprimidos no VIH es similar al de la población general, y la rentabilidad de las pruebas diagnósticas habituales (serología y PCR en médula ósea) es muy buena.
6. La dosis estándar de anfotericina B liposomal podría ser suficiente para el tratamiento en estos pacientes.
7. Recomendamos la retirada del tratamiento inmunosupresor durante la enfermedad visceral, así como la reintroducción del mismo de forma precoz tras el tratamiento. En los casos en que la retirada del tratamiento pueda implicar un brote de la enfermedad de base, recomendamos mantenerlo.
8. No recomendamos el uso sistemático de profilaxis secundaria en estos pacientes.

9. El seguimiento de los pacientes inmunosuprimidos curados de leishmaniasis visceral debe ser estrecho durante el primer año por el riesgo de recidiva. Un resultado positivo del test de linfoproliferación a SLA tras el tratamiento indicaría la existencia de inmunidad al parásito y permitiría la reintroducción de los inmunosupresores y la retirada de la profilaxis en el caso de que se hubiera iniciado. La negativización de este test durante el seguimiento es frecuente en estos pacientes y no indica necesariamente recidiva.
10. En pacientes en tratamiento con fármacos anti-TNF, el uso de corticoesteroides es un factor de riesgo adicional para el desarrollo de leishmaniasis. El riesgo de enfermedad es mayor con adalimumab que con el resto de fármacos anti-TNF.

7 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

7.1 Publicaciones en revistas internacionales

Botana L, Matía B, San Martín J V, Romero-Maté A, Castro A, Molina L, et al. **Cellular Markers of Active Disease and Cure in Different Forms of *Leishmania infantum*-Induced Disease.** *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2018;8:381.

7.2 Comunicaciones a congresos internacionales

Management of visceral leishmaniasis in patients under immunosuppressive treatments during outbreak in Fuenlabrada (Spain). B. Matia, E. Carrillo, J. San martin, L. Botana, A. Castro, L. Fernández, J. García-Martínez, A. Ibarra-Meneses, L. Molina, C. Sanchez, L. Horrillo, C. Chicharro, J. Hinojosa, J. Nieto, E. Canalejo, S. Ortega, J. Moreno, J. Ruiz-Giardin. **27th ECCMID, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Viena, Austria, abril de 2017)**

Prevalence of asymptomatic *Leishmania* infection in patients in biologic therapies: experience of leishmaniasis outbreak in Fuenlabrada, Spain. B. Matia, E. Carrillo, A. Castro, L. Botana, J. Ruiz-Giardin, L. Fernández, A. Ontañón, A. Ibarra-Meneses, A. Romero-Maté, C. Sanchez, L. Molina, C. Chicharro, J. Jaqueti, J. Nieto, S. Ortega, J. Moreno, J. San martin. **27th ECCMID, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Viena, Austria, abril de 2017)**

SLA-cell proliferation test comparison in active leishmaniasis vs. cured in different clinical leishmaniasis forms. L. Botana, E. Carrillo, J. San Martín López, A. Romero Maté, A. Castro, L. Molina, L. Fernández, A. Ibarra-Meneses, M. Aguado, C. Sánchez, B. Matía, L. Horrillo, C. Chicharro, J. Nieto, S. Ortega, J. Ruiz Giardin, J. Moreno. **6th World Congress on Leishmaniasis (Toledo, mayo de 2017)**

Asymptomatic infection in a cohort of patients under anti-TNF treatment. Experience of leishmaniasis outbreak in Fuenlabrada, Spain. B. Matía, E. Carrillo, J. San Martín López, L. Botana, A. Ontañón, L. Molina, L. Fernández, J. García-Martínez, A. Castro, A. Ibarra-Meneses,

C. Sánchez, J. Ruiz Giardin, J. Moreno. **6th World Congress on Leishmaniasis (Toledo, mayo de 2017).**

New approach for confirming cure in *Leishmania infantum* infected patients under immunosuppressor treatments. L. Botana, C. Sánchez, L. Fernández, A. Ibarra-Meneses, B. Matía, J. San Martín, E. Carrillo, J. Moreno. **6th World Congress on Leishmaniasis (Toledo, mayo de 2017).**

SLA-cell proliferation test useful on management of visceral leishmaniasis patients under immunosuppressor treatments. B. Matía, E. Carrillo, J. San Martín, L. Botana, A. Castro, L. Fernández, J. García-Martínez, A. Ibarra-Meneses, L. Horrillo, C. Sánchez, C. Chicharro, J. Nieto, S. Ortega, J. Ruiz Giardin, J. Moreno. **6th World Congress on Leishmaniasis (Toledo, mayo de 2017).**

Comparative study of visceral leishmaniasis in immunocompetents, HIV patients and patients under immunosuppressive therapy during the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain): Clinical manifestations, evolution, and immunological response. A. Castro, B. Matía, E. Carrillo, L. Botana, L. Fernández, L. Molina, A. Ibarra-Meneses, J. García-Martínez; C. Sánchez, J. Jaquetti, L. Horrillo, I. García-Arata, J. Ruiz Giardin, J. Moreno, J. San Martín. **6th World Congress on Leishmaniasis (Toledo, mayo de 2017).**

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Jimenez-Marco T, Fisa R, Girona-Llobera E, Cancino-Faure B, Tomás-Pérez M, Berenguer D, et al. Transfusion-transmitted leishmaniasis: a practical review. *Transfusion*. 2016 Mar;56:S45–51.
2. Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics*. 1999 Nov;104(5):e65.
3. SYMMERS WS. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet (London, England)*. 1960 Jan 16;1(7116):127–32.
4. Cruz I, Morales MA, Noguera I, Rodríguez A, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet (London, England)*. 2002 Mar 30;359(9312):1124–5.
5. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012 Jan;7(5):e35671.
6. Ejev M, Dagne D. Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014-2020. *World Health Organ*. 2014;1–17.
7. Carrillo E, Moreno J, Cruz I. What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid? *Trends Parasitol*. 2013 Dec 12;29(12):579–80.
8. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2010 Jan;(949):xii–xiii, 1-186, back cover.
9. *Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid*. 2011;17(12).
10. Suárez Rodríguez B, Isidoro Fernández B, Santos Sanz S, Sierra Moros MJ, Molina Moreno R, Astray Mochales J, et al. [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. *Rev Esp Salud Publica*. 2012 Dec;86(6):555–64.
11. Herrador Z, Gherasim A, Jimenez BC, Granados M, San Martín JV, Aparicio P. Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-based records, 1997-2011: raising awareness towards leishmaniasis in non-HIV patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Mar;9(3):e0003594.
12. 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)*. 2003 May;82(3):147–58.
13. Garcia-Gonzalez E, Guidelli GM, Bardelli M, Maggio R. Mucocutaneous leishmaniasis in a patient treated with anti-TNF- α therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 2012 Aug 1;51(8):1517–8.
14. Madeddu G, Fiori ML, Ena P, Riu F, Lovigu C, Nunnari G, et al. Mucocutaneous leishmaniasis as presentation of HIV infection in Sardinia, insular Italy. *Parasitol Int*. 2014 Feb;63(1):35–6.
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 Nov;5(11):873–82.
16. Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016 Mar;53(1):8–16.

17. Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. Franco-Paredes C, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jan 31;6(1):e1484.
18. Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*. 2006 Oct 7;333(7571):723.
19. Sudarshan M, Sundar S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Sep;80(1):40–2.
20. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. *Drugs*. 2013 Nov 30;73(17):1863–88.
21. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet J-P, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Apr 1;21(2):334–59, table of contents.
22. Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region (2017). 2018 Jun 20;
23. 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*. 2016 Dec 15;63(12):e202–64.
24. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Drugs*. 2013 Nov 30;73(17):1889–920.
25. 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 Jan;18(30):20546.
26. Gomez-Barroso D, Herrador Z, San Martin J V, Gherasim A, Aguado M, Romero-Mate A, et al. Spatial distribution and cluster analysis of a leishmaniasis outbreak in the south-western Madrid region, Spain, September 2009 to April 2013. *Euro Surveill*. 2015 Jan;20(7):11–20.
27. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*. 2012 Nov 23;190(1–2):268–71.
28. Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fúster F, et al. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res*. 2013 Jul 28;112(7):2453–9.
29. 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 May 28;202(3–4):296–300.
30. 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 Jan;18(30):20545.
31. Domínguez-Bernal G, Jiménez M, Molina R, Ordóñez-Gutiérrez L, Martínez-Rodrigo A, Mas A, et al. Characterisation of the ex vivo virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from an outbreak of human leishmaniasis in Madrid,

- Spain. *Parasit Vectors*. 2014 Nov 7;7(1):499.
32. Horrillo L, San Martín J V, 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*. 2015 Mar;21(3):269–73.
 33. Aguado M, Espinosa P, Romero-Maté A, Tardío JC, Córdoba S, Borbujo J. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Fuenlabrada, Madrid. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104:334–42.
 34. Sevá A da P, Martcheva M, Tuncer N, Fontana I, Carrillo E, Moreno J, et al. Efficacies of prevention and control measures applied during an outbreak in Southwest Madrid, Spain. Pizarro JC, editor. *PLoS One*. 2017 Oct 13;12(10):e0186372.
 35. Chicharro C, Jiménez MI, Alvar J. Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003 Oct 2;97 Suppl 1(sup1):57–64.
 36. Baptista-Fernandes T, Marques C, Roos Rodrigues O, Santos-Gomes GM. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007 Jan;30(1):41–53.
 37. Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, Campino L, Haralambous C, et al. Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmania infantum* MON-1. Jaffe C, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Jul 9;2(7):e261.
 38. Campos-Ponce M, Ponce C, Ponce E, Maingon RDC. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania tropisms* in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Exp Parasitol*. 2005 Apr;109(4):209–19.
 39. Singh OP, Stober CB, Singh AK, Blackwell JM, Sundar S. Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis. Carvalho EM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Oct 25;6(10):e1874.
 40. Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1987 Dec;156(6):1030–3.
 41. Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun*. 2001 Aug 1;69(8):4709–18.
 42. Karplus TM, Jeronimo SMB, Chang H, Helms BK, Burns TL, Murray JC, et al. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):6919–25.
 43. BLACKWELL JM, FAKIOLA M, IBRAHIM ME, JAMIESON SE, JERONIMO SB, MILLER EN, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol*. 2009 May;31(5):254–66.
 44. Moral L, Rubio EM, Moya M. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacantí region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Jan;96(2):129–32.
 45. Ali A, Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relation of infection to disease in an endemic area. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994 Jun;88(3):289–93.
 46. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*. 2005;99(1):17–23.
 47. Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto

- MP, et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Aug;102(5):625–30.
48. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. In: *Advances in applied microbiology*. 2013. p. 155–84.
49. Bogdan C. Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. *Ann Rheum Dis*. 2012 Apr;71 Suppl 2:i60-6.
50. Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol*. 2008 Jun;10(6):1221–34.
51. le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):1953–7.
52. 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*. 2004 Mar 15;189(6):1018–23.
53. Dereure J, Duong Thanh H, Lavabre-Bertrand T, Cartron G, Bastides F, Richard-Lenoble D, et al. Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure. *J Infect*. 2003 Jul;47(1):77–81.
54. de Rossell RA, de Duran RJ, Rossell O, Rodríguez AM. Is leishmaniasis ever cured? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 86(3):251–3.
55. Nicodemo AC, de Camargo RA, Amato VS, Sakumoto MH, Battaglin ER, Bombonato GM, et al. Reactivation of Mucosal and Cutaneous Leishmaniasis in a Renal Transplanted Patient. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Jul 2;91(1):81–3.
56. Jewell AP, Giles FJ. Cutaneous Manifestation of Leishmaniasis 40 Years After Exposure in a Patient with Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1996 Jan;21(3–4):347–9.
57. Körner H, McMorran B, Schlüter D, Fromm P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. *Int J Parasitol*. 2010 Jul;40(8):879–88.
58. Ritter U, Lechner A, Scharl K, Kiafard Z, Zwirner J, Körner H. TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Med Microbiol Immunol*. 2008 Mar 19;197(1):29–37.
59. Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology*. 1990 Apr;69(4):570–3.
60. Titus RG, Sherry B, Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1989 Dec 1;170(6):2097–104.
61. Garcia I, Miyazaki Y, Araki K, Araki M, Lucas R, Grau GE, et al. Transgenic mice expressing high levels of soluble TNF-R1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and are highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* infections. *Eur J Immunol*. 1995 Aug;25(8):2401–7.
62. Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, et al. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol*. 2001 Mar 15;166(6):4012–9.
63. Murray HW, Jungbluth A, Ritter E, Montelibano C, Marino MW. Visceral leishmaniasis in

- mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. *Infect Immun*. 2000 Nov;68(11):6289–93.
64. Tumang MC, Keogh C, Moldawer LL, Helfgott DC, Teitelbaum R, Hariprashad J, et al. Role and effect of TNF- α in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1994 Jul 15;153(2):768–75.
65. Allenbach C, Launois P, Mueller C, Tacchini-Cottier F. An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*. 2008 Mar;38(3):720–31.
66. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(2):138–47.
67. Oliveira F, Báfica A, Rosato AB, Favali CBF, Costa JM, Cafe V, et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Jul 1;85(1):70–3.
68. Báfica A, Oliveira F, Freitas LAR, Nascimento EG, Barral A. American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *Int J Dermatol*. 2003 Mar;42(3):203–7.
69. Machado PRL, Lessa H, Lessa M, Guimaraes LH, Bang H, Ho JL, et al. Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 15;44(6):788–93.
70. Vieira LQ, Goldschmidt M, Nashleanas M, Pfeffer K, Mak T, Scott P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):827–35.
71. Nashleanas M, Kanaly S, Scott P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. *J Immunol*. 1998 Jun 1;160(11):5506–13.
72. Nashleanas M, Scott P. Activated T cells induce macrophages to produce NO and control *Leishmania major* in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. *Infect Immun*. 2000 Mar;68(3):1428–34.
73. Ritter U, Mattner J, Rocha JS, Bogdan C, Körner H. The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes Infect*. 2004 May;6(6):559–65.
74. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/ HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003 Oct 2;97(sup1):3–15.
75. Carrasco-Antón N, López-Medrano F, Fernández-Ruiz M, Carrillo E, Moreno J, García-Reyne A, et al. Environmental Factors as Key Determinants for Visceral Leishmaniasis in Solid Organ Transplant Recipients, Madrid, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2017 Jul;23(7):1155–9.
76. van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr 4;20(4):286–99.
77. Fernández-Ruiz M, Aguado JM. Risk of infection associated with anti-TNF- α therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018 Nov 2;14787210.2018.1544490.
78. Cohen S, Kay J. Biosimilars. *Curr Opin Rheumatol*. 2017 May;29(3):260–8.
79. Carmona L, Descalzo MA, Ruiz-Montesinos D, Manero-Ruiz FJ, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, et al. Safety and retention rate of off-label uses of TNF antagonists in

- rheumatic conditions: data from the Spanish registry BIOBADASER 2.0. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Jan 1;50(1):85–92.
80. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor α monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. *Lancet*. 1999 Dec 4;354(9194):1932–9.
 81. Garcia-Vidal C, Rodríguez-Fernández S, Teijón S, Esteve M, Rodríguez-Carballeira M, Lacasa JM, et al. Risk factors for opportunistic infections in infliximab-treated patients: the importance of screening in prevention. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Apr;28(4):331–7.
 82. Curtis JR, Patkar N, Xie A, Martin C, Allison JJ, Saag M, et al. Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists. *Arthritis Rheum*. 2007 Apr;56(4):1125–33.
 83. Curtis JR, Xi J, Patkar N, Xie A, Saag KG, Martin C. Drug-specific and time-dependent risks of bacterial infection among patients with rheumatoid arthritis who were exposed to tumor necrosis factor α antagonists. *Arthritis Rheum*. 2007 Dec;56(12):4226–7.
 84. Grijalva CG, Chen L, Delzell E, Baddley JW, Beukelman T, Winthrop KL, et al. Initiation of tumor necrosis factor- α antagonists and the risk of hospitalization for infection in patients with autoimmune diseases. *JAMA*. 2011 Dec 7;306(21):2331–9.
 85. Singh JA, Wells GA, Christensen R, Tanjong Ghogomu E, Maxwell L, Macdonald JK, et al. Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *Cochrane database Syst Rev*. 2011 Jan;(2):CD008794.
 86. Singh JA, Cameron C, Noorbaloochi S, Cullis T, Tucker M, Christensen R, et al. Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2015 May 18;386(9990):258–65.
 87. Fouque-Aubert A, Jette-Paulin L, Combescore C, Basch A, Tebib J, Gossec L. Serious infections in patients with ankylosing spondylitis with and without TNF blockers: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis*. 2010 Oct 1;69(10):1756–61.
 88. Wang S, He Q, Shuai Z. Risk of serious infections in biological treatment of patients with ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2018 Feb;37(2):439–50.
 89. Dommasch ED, Abuabara K, Shin DB, Nguyen J, Troxel AB, Gelfand JM. The risk of infection and malignancy with tumor necrosis factor antagonists in adults with psoriatic disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Jun;64(6):1035–50.
 90. Bonovas S, Fiorino G, Allocca M, Lytras T, Nikolopoulos GK, Peyrin-Biroulet L, et al. Biologic Therapies and Risk of Infection and Malignancy in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016 Oct;14(10):1385–1397.e10.
 91. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med*. 1999 Jan 28;340(4):253–9.
 92. Moreland LW, Bucy RP, Weinblatt ME, Mohler KM, Spencer-Green GT, Chatham WW. Immune function in patients with rheumatoid arthritis treated with etanercept. *Clin*

- Immunol. 2002 Apr;103(1):13–21.
93. Wallis RS, Ehlers S. Tumor necrosis factor and granuloma biology: explaining the differential infection risk of etanercept and infliximab. *Semin Arthritis Rheum*. 2005 Apr 4;34(5 Suppl1):34–8.
 94. Salmon-Ceron D, Tubach F, Lortholary O, Chosidow O, Bretagne S, Nicolas N, et al. Drug-specific risk of non-tuberculosis opportunistic infections in patients receiving anti-TNF therapy reported to the 3-year prospective French RATIO registry. *Ann Rheum Dis*. 2011 Apr;70(4):616–23.
 95. Dixon WG, Watson K, Lunt M, Hyrich KL, Silman AJ, Symmons DPM. Rates of serious infection, including site-specific and bacterial intracellular infection, in rheumatoid arthritis patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2368–76.
 96. Dixon WG, Symmons DPM, Lunt M, Watson KD, Hyrich KL, Silman AJ, et al. Serious infection following anti-tumor necrosis factor α therapy in patients with rheumatoid arthritis: Lessons from interpreting data from observational studies. *Arthritis Rheum*. 2007 Sep;56(9):2896–904.
 97. Strangfeld A, Eveslage M, Schneider M, Bergerhausen HJ, Klopsch T, Zink A, et al. Treatment benefit or survival of the fittest: what drives the time-dependent decrease in serious infection rates under TNF inhibition and what does this imply for the individual patient? *Ann Rheum Dis*. 2011 Nov;70(11):1914–20.
 98. Winthrop KL. Infections and biologic therapy in rheumatoid arthritis: our changing understanding of risk and prevention. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012 Nov;38(4):727–45.
 99. Minozzi S, Bonovas S, Lytras T, Pecoraro V, González-Lorenzo M, Bastiampillai AJ, et al. Risk of infections using anti-TNF agents in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf*. 2016 Dec 5;15(sup1):11–34.
 100. Wallis RS, Broder MS, Wong JY, Hanson ME, Beenhouwer DO. Granulomatous Infectious Diseases Associated with Tumor Necrosis Factor Antagonists. *Clin Infect Dis*. 2004 May 1;38(9):1261–5.
 101. Wallis RS, Broder M, Wong J, Beenhouwer D. Granulomatous Infections Due to Tumor Necrosis Factor Blockade: Correction. *Clin Infect Dis*. 2004 Oct 15;39(8):1254–5.
 102. Dixon WG, Hyrich KL, Watson KD, Lunt M, Galloway J, Ustianowski A, et al. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Ann Rheum Dis*. 2010 Mar 1;69(3):522–8.
 103. Fonseca JE, Canhão H, Silva C, Miguel C, Mediavilla MJ, Teixeira A, et al. [Tuberculosis in rheumatic patients treated with tumour necrosis factor alpha antagonists: the Portuguese experience]. *Acta Reumatol Port*. 31(3):247–53.
 104. Tubach F, Salmon D, Ravaud P, Allanore Y, Goupille P, Bréban M, et al. Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective french research axed on tolerance of biotherapies registry. *Arthritis Rheum*. 2009 Jul;60(7):1884–94.
 105. Furst DE, Wallis R, Broder M, Beenhouwer DO. Tumor necrosis factor antagonists:

- different kinetics and/or mechanisms of action may explain differences in the risk for developing granulomatous infection. *Semin Arthritis Rheum*. 2006 Dec 12;36(3):159–67.
106. Saliu OY, Sofer C, Stein DS, Schwander SK, Wallis RS. Tumor-necrosis-factor blockers: differential effects on mycobacterial immunity. *J Infect Dis*. 2006 Aug 15;194(4):486–92.
 107. Olleros ML, Guler R, Corazza N, Vesin D, Eugster H-P, Marchal G, et al. Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection in the absence of secreted TNF and lymphotoxin-alpha. *J Immunol*. 2002 Apr 1;168(7):3394–401.
 108. Bagalas V, Kioumis I, Argyropoulou P, Patakas D. Visceral leishmaniasis infection in a patient with rheumatoid arthritis treated with etanercept. *Clin Rheumatol*. 2007 Aug;26(8):1344–5.
 109. Baltà-Cruz S, Alsina-Gilbert M, Mozos-Rocafort A, Cervera C, Colomo-Saperas L, Del Río A, et al. Pseudolymphomatoid cutaneous leishmaniasis in a patient treated with adalimumab for rheumatoid arthritis. *Acta Derm Venereol*. 2009 Jan;89(4):432–3.
 110. Bassetti M, Pizzorni C, Gradoni L, Del Bono V, Cutolo M, Viscoli C. Visceral leishmaniasis infection in a rheumatoid arthritis patient treated with adalimumab. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Nov;45(11):1446–8.
 111. Berry CE, Tsai J, Tierney A, Pickles R. Visceral leishmaniasis in a patient taking adalimumab for rheumatoid arthritis. *Med J Aust*. 2013 Apr 1;198(6):331–3.
 112. Besada E, Njålla RJ, Nossent JC. Imported case of visceral leishmaniasis presenting as pancytopenia in a Norwegian patient treated with methotrexate and etanercept for psoriasis arthritis. *Rheumatol Int*. 2013 Oct;33(10):2687–9.
 113. Bousquet E, Mura F, Villain M, Rivière S, Konate a, Schneider C. [Infectious complications in patients treated with anti-TNF-alpha: two cases of leishmaniasis]. *J Fr Ophtalmol*. 2012 Nov;35(9):695–9.
 114. Català A, Barnadas MA, Muñoz C, Puig L. Leishmaniasis cutánea en un paciente con artritis psoriásica tratado con infliximab: tratamiento con crioterapia y Glucantime® intralesional. *Actas Dermosifiliogr*. 2014 Sep;105(7):714–6.
 115. Català A, Roé E, Dalmau J, Pomar V, Muñoz C, Yelamos O, et al. Anti-tumour necrosis factor-induced visceral and cutaneous leishmaniasis: case report and review of the literature. *Dermatology*. 2015 Jan;230(3):204–7.
 116. De Leonardis F, Govoni M, Lo Monaco A, Trotta F. Visceral leishmaniasis and anti-TNF-alpha therapy: case report and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27:503–6.
 117. Erre GL, Mesina P, Tonelli N, Passiu G. Visceral Leishmaniasis among immunosuppressed patients with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 28(4):590–1.
 118. Fabre S, Gibert C, Lechiche C, Dereure J, Jorgensen C, Sany J. Visceral leishmaniasis infection in a rheumatoid arthritis patient treated with infliximab. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:891–2.
 119. Franklin G, Greenspan J, Chen S. Case report: Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy provokes latent leishmaniasis in a patient with rheumatoid arthritis. *Ann Clin Lab Sci*. 2009;39(2):192–5.
 120. García-Castro JM, Javier-Martínez R, Cáliz-Cáliz R, García-Sánchez A. [Persistent inflammation of the nasal dorsum in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012 Jan;30(1):40–2.

121. Gomes KWP, Benevides AN, Vieira FJF, Burlamaqui MP de M, Vieira M de A e P, Fontenelle LMAR. Cutaneous leishmaniasis in a patient with ankylosing spondylitis using adalimumab. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52(3):447–52.
122. Guarneri C, Bevelacqua V, Patterson JW, Tchernev G. Cutaneous and visceral leishmaniasis during anti-TNF α therapy. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2017 Mar 10;167(3–4):78–82.
123. 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). *Semin Arthritis Rheum*. 2013 Oct;43(2):152–7.
124. Hakimi S, Rivière S, Del Giudice P, Dereure J, Le Quellec A. Localized Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a Patient Treated with Infliximab. *Dermatology*. 2010 Jan;220(1):63–5.
125. Hernández MV, Sanmartí R, Cañete JD, Descalzo MA, Alsina M, Carmona L, et al. Cutaneous Adverse Events During Treatment of Chronic Inflammatory Rheumatic Conditions With Tumor Necrosis Factor Antagonists: Study Using the Spanish Registry of Adverse Events of Biological Therapies in Rheumatic Diseases. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013 Dec 27;65(12):2024–31.
126. Jeziorski E, Blanchet C, Ludwig C, Lalande M, Coste V, Dereure J, et al. [Pseudotumoral-like recurrence of visceral leishmaniasis in a seven-year-old girl]. *Arch Pediatr*. 2009 Oct;16 Suppl 2:S129-31.
127. Jeziorski E, Dereure J, Mac Bullen G, Blanchet C, Ludwig C, Costes V, et al. Mucosal relapse of visceral leishmaniasis in a child treated with anti-TNF α . *Int J Infect Dis*. 2015 Apr 4;33:135–6.
128. Juzlova K, Votrubova J, Kacerovska D, Lukas M, Bortlik M, Rohacova H, et al. Visceral leishmaniasis with cutaneous symptoms in a patient treated with infliximab followed by fatal consequences. *Dermatol Ther*. Jan;27(3):131–4.
129. Khan A, Coakley G, Cosgrove C, Lockwood D. Let off the leash: kala-azar following the use of tumour necrosis factor antibodies. *BMJ Case Rep*. 2010 Oct 13;2010(oct12 2):bcr0420102878-bcr0420102878.
130. Kritikos K, Haritatos E, Tsigkos S, Gounari P, Skrapari I, Gounaris T, et al. An atypical presentation of visceral leishmaniasis infection in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab. *J Clin Rheumatol*. 2010 Jan;16(1):38–9.
131. Micallef C, Azzopardi CM. Atypical cutaneous leishmaniasis in the immunosuppressed. *BMJ Case Rep*. 2014 Jan;2014.
132. Moltó A, Mateo L, Lloveras N, Olivé A, Minguez S. Visceral leishmaniasis and macrophagic activation syndrome in a patient with rheumatoid arthritis under treatment with adalimumab. *Joint Bone Spine*. 2010 May;77(3):271–3.
133. Moreno D, Martínez P, Berbegal J, Femenia M. [Visceral leishmaniasis infection in a rheumatoid arthritis patient treated with adalimumab: a case description and literature review]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Apr;28(4):261–2.
134. Mueller MC, Fleischmann E, Grunke M, Schewe S, Bogner JR, Löscher T. Relapsing cutaneous leishmaniasis in a patient with ankylosing spondylitis treated with infliximab. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Jul;81(1):52–4.
135. 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- α antagonists. *Travel Med Infect Dis*. 2013 Nov;11(6):412–20.
136. Pizzorni C, Secchi ME, Cutolo M. [Leishmaniasis in rheumatoid arthritis]. *Reumatismo*. Jan;59(3):235–9.
 137. Romaní-Costa V, Sánchez C, Moyá F, Estany C. [Visceral leishmaniasis related to infliximab administration]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 May;22(5):310.
 138. Romero-Maté A, Martínez-Sánchez D, Tardío JC, Moreno-Torres A, García-Donoso C, Aguado-Lobo M, et al. Cutaneous leishmaniasis with histopathologic pattern of non-necrotizing granulomatous dermatitis in patients treated with adalimumab. *Dermatol Online J*. 2012 Sep 1;18(9).
 139. Schneider P, Bouaziz JD, Foulet F, Duong T a, Allanore LV, Bagot M. [Multifocal cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* under adalimumab therapy]. *Ann Dermatol Venereol*. 2009 Nov;136(11):815–6.
 140. Tektonidou MG, Skopouli FN. Visceral leishmaniasis in a patient with psoriatic arthritis treated with infliximab: reactivation of a latent infection? *Clin Rheumatol*. 2008 Apr;27(4):541–2.
 141. Tung Chen Y, Perales C, Lacruz J, Senent L, Salavert M. Visceral leishmaniasis infection during adalimumab therapy: a case report and literature review. *Int J Rheum Dis*. 2014 Sep;17(7):822–4.
 142. Xynos ID, Tektonidou MG, Pikazis D, Sipsas N V. Leishmaniasis, autoimmune rheumatic disease, and anti-tumor necrosis factor therapy, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jun;15(6):956–9.
 143. Zanger P, Kötter I, Kreamsner PG, Gabrysch S, Ko I, Universita EK, et al. Tumor necrosis factor alpha antagonist drugs and leishmaniasis in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(7):670–6.
 144. Zanger P, Kötter I, Raible A, Gelanew T, Schönian G, Kreamsner PG. Case report: Successful treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania aethiopica* with liposomal amphotericin B in an immunocompromised traveler returning from Eritrea. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 May;84(5):692–4.
 145. Darcis G, Van der Auwera G, Giot J-B, Hayette M-P, Tassin F, Arrese Estrada J, et al. Recurrence of visceral and muco-cutaneous leishmaniasis in a patient under immunosuppressive therapy. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):478.
 146. Guidelli GM, De Stefano R, Galeazzi M, Selvi E. Synovial Leishmaniasis. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Apr;68(4):931–931.
 147. Habibi Naderizadeh S, Valcárcel Sierra C, Medrano Gallego L, Flores Robles BJ, Roustán-Gullón LG. Leishmaniasis mucocutánea en pacientes inmunocomprometidos: reporte de 4 casos autóctonos. *Actas Dermosifiliogr*. 2018 Apr;109(3):281–4.
 148. Hernandez Bel L, Hernández Garfella ML, Chiarri Toumit C, Valenzuela Oñate C. Leishmaniasis cutánea inducida por anti-factor de necrosis tumoral en paciente con artritis psoriásica y uveítis. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2018 Aug 9;
 149. Herrerías-Moreno J, Expósito-Serrano V, Agut-Busquet E, Corbacho M, Sáez E, Luelmo J. Cutaneous leishmaniasis mimicking dactylitis in a patient with rheumatoid arthritis treated with certolizumab. *Clin Exp Dermatol*. 2018 Apr;43(3):348–50.
 150. Nicodemo AC, Duailibi DF, Feriani D, Duarte MIS, Amato VS. Mucosal leishmaniasis mimicking T-cell lymphoma in a patient receiving monoclonal antibody against TNF α . Bentwich Z, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Sep 21;11(9):e0005807.

151. Riera C, Cuadrado M, Berenguer D, Guillén MC, Rocamora V, Fisa R, et al. Case Report: Diffuse Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania infantum* in a Patient Undergoing Immunosuppressive Therapy: Risk Status in an Endemic Mediterranean Area. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 May 9;98(5):1313–6.
152. Arens K, Filippis C, Kleinfelder H, Goetzee A, Reichmann G, Crauwels P, et al. Anti-Tumor Necrosis Factor α Therapeutics Differentially Affect *Leishmania* Infection of Human Macrophages. *Front Immunol.* 2018;9:1772.
153. Pittalis S, Nicastrì E, Spinazzola F, Ghirga P, De Marco M, Paglia MG, et al. *Leishmania infantum* leishmaniasis in corticosteroid--treated patients. *BMC Infect Dis.* 2006 Dec 18;6(1):177.
154. Rousseau D, Suffia I, Ferrua B, Philip P, Le Fichoux Y, Kubar JL. Prolonged administration of dexamethasone induces limited reactivation of visceral leishmaniasis in chronically infected BALB/c mice. *Eur Cytokine Netw.* 1998 Dec;9(4):655–61.
155. Garcia-Cordoba F, Ortuño FJ, Segovia M, Gonzalez Diaz G. Fatal visceral leishmaniasis, with massive bone-marrow infection, in an immunosuppressed but HIV-negative Spanish patient, after the initiation of treatment with meglumine antimoniate. *Ann Trop Med Parasitol.* 2005 Mar 18;99(2):125–30.
156. Motta ACF, Arruda D, Souza CS, Foss NT. Disseminated mucocutaneous leishmaniasis resulting from chronic use of corticosteroid. *Int J Dermatol.* 2003 Sep;42(9):703–6.
157. Tuon FF, Sabbaga Amato V, Floeter-Winter LM, de Andrade Zampieri R, Amato Neto V, Siqueira França FO, et al. Cutaneous leishmaniasis reactivation 2 years after treatment caused by systemic corticosteroids - first report. *Int J Dermatol.* 2007 Jun;46(6):628–30.
158. Loarce-Martos J, Garrote-Corral S, Gioia F, Bachiller-Corral J. Leishmaniasis visceral en un paciente con artritis reumatoide en tratamiento con metotrexato. *Reumatol Clínica.* 2017 Sep 25;
159. Karagiannidis GS, Mantzourani M, Meletis J, Anastasopoulou AN, Vaiopoulos GA. Visceral Leishmaniasis in a Rheumatoid Arthritis Patient Treated With Methotrexate. *J Clin Rheumatol.* 2012 Jan;18(1):59.
160. Venizelos I, Tatsiou Z, Papathomas TG, Orazi A. Visceral leishmaniasis in a rheumatoid arthritis patient treated with methotrexate. *Int J Infect Dis.* 2009 Jul;13(4):e169–72.
161. Trigkidis K, Geladari E, Kokkinakis E, Vallianou N. Visceral Leishmaniasis in a patient with rheumatoid arthritis undergoing treatment with methotrexate: Case report and review of the literature. *Eur J Rheumatol.* 2017 Jun;4(2):139–41.
162. Mahmoudvand H, Kheirandish F, Mirbadie SR, Kayedi MH, Rezaei Riabi T, Ghasemi AA, et al. The Potential Use of Methotrexate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: In Vitro Assays against Sensitive and Meglumine Antimoniate-resistant Strains of *Leishmania tropica*. *Iran J Parasitol.* 12(3):339–47.
163. Schwartz J, Moreno E, Calvo A, Blanco L, Fernández-Rubio C, Sanmartín C, et al. Combination of paromomycin plus human anti-TNF- α antibodies to control the local inflammatory response in BALB/ mice with cutaneous leishmaniasis lesions. *J Dermatol Sci.* 2018 Oct;92(1):78–88.
164. Pérez-Cutillas P, Goyena E, Chitimia L, De la Rúa P, Bernal LJ, Fisa R, et al. Spatial distribution of human asymptomatic *Leishmania infantum* infection in southeast Spain: A study of environmental, demographic and social risk factors. *Acta Trop.* 2015;146.
165. Moreno EC, Gonçalves AV, Chaves AV, Melo MN, Lambertucci JR, Andrade ASR, et al.

- Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by *Leishmania infantum*. Boelaert M, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Oct 20;3(10):e536.
166. Romero HD, Silva L de A, Silva-Vergara ML, Rodrigues V, Costa RT, Guimarães SF, et al. Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Jul;81(1):27–33.
 167. Vallur AC, Reinhart C, Mohamath R, Goto Y, Ghosh P, Mondal D, et al. Accurate Serodetection of Asymptomatic *Leishmania donovani* Infection by Use of Defined Antigens. *J Clin Microbiol*. 2016 Apr 1;54(4):1025–30.
 168. Das VNR, Siddiqui NA, Verma RB, Topno RK, Singh D, Das S, et al. Asymptomatic infection of visceral leishmaniasis in hyperendemic areas of Vaishali district, Bihar, India: a challenge to kala-azar elimination programmes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011 Nov;105(11):661–6.
 169. Maritati M, Trentini A, Michel G, Bellini T, Almugadam S, Hanau S, et al. Subclinical *Leishmania* infection in patients with rheumatic diseases under biological drugs. *Infection*. 2018 Aug 10;
 170. Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin Infect Dis*. 2014 May 15;58(10):1424–9.
 171. Bern C, Amann J, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, et al. Loss of leishmanin skin test antigen sensitivity and potency in a longitudinal study of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Oct;75(4):744–8.
 172. 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. Bates PA, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Apr 19;5(4):e1042.
 173. Castro A, Carrillo E, San Martín J V., 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*. 2016 Dec;164:345–51.
 174. 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. Hailu A, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Oct 23;9(10):e0004179.
 175. Ibarra-Meneses A V, Carrillo E, Sánchez C, García-Martínez J, López Lacombe D, San Martín J V, et al. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Aug;22(8):739.e1-4.
 176. Costa SR, D'Oliveira Júnior A, Bacellar O, Carvalho EM. T Cell Response of Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infected Subjects to Recombinant *Leishmania* Antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 May;94(3):367–70.
 177. de Gouvêa Viana L, de Assis TSM, 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 Jun;102(6):548–55.
 178. Ibarra-Meneses A V., Ghosh P, Hossain F, Chowdhury R, Mondal D, Alvar J, et al. IFN- γ , 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 May 31;7:200.

179. Ibarra-Meneses A V., 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 Sep 29;8:1208.
180. Singh OP, Sundar S. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises. *Immunobiology*. 2014 Apr;219(4):323–8.
181. Turgay N, Balcioglu IC, Toz SO, Ozbel Y, Jones SL. Quantiferon-Leishmania as an epidemiological tool for evaluating the exposure to *Leishmania* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Oct 5;83(4):822–4.
182. Sassi A, Ben Salah A, Hamida NBH, Zaatour A. Age related efficiency of the leishmanin skin test as a marker of immunity to human visceral leishmaniasis. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 2012 Jan;89(1–4):23–31.
183. De Almeida Silva L, Romero HD, Prata A, Costa RT, Nascimento E, Carvalho SFG, et al. Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Oct;75(4):739–43.
184. Castro A. Estudio del impacto del brote de leishmaniasis en la cohorte de pacientes VIH del Hospital Universitario de Fuenlabrada. Universidad Rey Juan Carlos; 2016.
185. Cunha J, Carrillo E, Sánchez C, Cruz I, Moreno J, Cordeiro-da-Silva A. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2013 Apr 26;6(1):122.
186. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004 Feb;98(2):102–10.
187. Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Trop*. 2011 Aug;119(2–3):69–75.
188. Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A, Dellagi K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol*. 1999 Apr;116(1):127–32.
189. VVAA. 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, editor. 2017. 289 p.
190. Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis*. 1986 Oct;154(4):639–49.
191. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jul 1;14(3):476–88.
192. Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun*. 2002 May;70(5):2288–96.
193. Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR. Sex Hormones and Modulation of Immunity against Leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(2):106–13.

194. Carmona L. Epidemiología de la artritis reumatoide. *Rev Española Reumatol.* 2002;29(3):73–124.
195. Galloway JB, Hyrich KL, Mercer LK, Dixon WG, Fu B, Ustianowski AP, et al. Anti-TNF therapy is associated with an increased risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis especially in the first 6 months of treatment: updated results from the British Society for Rheumatology Biologics Register with special emph. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Jan;50(1):124–31.
196. Pagliano P, Esposito S. Visceral leishmaniasis in immunocompromised host: an update and literature review. *J Chemother.* 2017 Sep 3;29(5):261–6.
197. Fernández-Guerrero ML, Robles P, Rivas P, Mójér F, Muñiz G, de Górgolas M. Visceral leishmaniasis in immunocompromised patients with and without AIDS: a comparison of clinical features and prognosis. *Acta Trop.* 2004 Mar;90(1):11–6.
198. Montero M, Ramos JM, Portilla J, Blanes M, Merino E, Boix V, et al. Is Visceral Leishmaniasis Different in Immunocompromised Patients Without Human Immunodeficiency Virus? A Comparative, Multicenter Retrospective Cohort Analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 Oct 11;97(4):1127–33.
199. Schulzke I, Mravak S, Weber B. [Kala-azar with marked ferritinemia in a German school child]. *Monatsschr Kinderheilkd.* 1987 Oct;135(10):705–7.
200. Held TK, Trautmann M, Poggensee U, Mravak S. Ferritin as the earliest prognostic marker in a case of visceral leishmaniasis. *J Infect.* 1991 Jul 1;23(1):103–4.
201. Alvar J, Gutiérrez-Solar B, Pachón T, Calbacho E, Ramírez M, Vallés R, et al. AIDS and *Leishmania infantum*. *Clin Dermatol.* 1996 Sep;14(5):541–6.
202. García-Almagro D. [Cutaneous leishmaniasis]. *Actas Dermosifiliogr.* 96(1):1–24.
203. Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed Res Int.* 2013;2013:805108.
204. Freites-Martinez 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 Aug;33(7):499–500.
205. Oliveira CF, Manzoni-de-Almeida D, Mello PS, Natale CC, Santiago H da C, Miranda L da S, et al. Characterization of Chronic Cutaneous Lesions from TNF-Receptor-1-Deficient Mice Infected by *Leishmania major*. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:1–12.
206. Acedo Sánchez C, Martín Sánchez J, Vélez Bernal ID, Sanchís Marín MC, Louassini M, Maldonado JA, et al. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int J Parasitol.* 1996 Mar;26(3):303–10.
207. Gramiccia M, Bettini S, Gradoni L, Ciarmoli P, Verrilli ML, Loddo S, et al. Leishmaniasis in Sardinia. 5. Leishmanin reaction in the human population of a focus of low endemicity of canine leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 84(3):371–4.
208. Rutherford AI, Subesinghe S, Hyrich KL, Galloway JB. Serious infection across biologic-treated patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2018 Mar 28;77(6):annrheumdis-2017-212825.
209. Cobo-Ibáñez T, Descalzo MÁ, Loza-Santamaría E, Carmona L, Muñoz-Fernández S. Serious infections in patients with rheumatoid arthritis and other immune-mediated connective tissue diseases exposed to anti-TNF or rituximab: data from the Spanish registry BIOBADASER 2.0. *Rheumatol Int.* 2014 Jul;34(7):953–61.

210. Osterman MT, Sandborn WJ, Colombel J-F, Peyrin-Biroulet L, Robinson AM, Zhou Q, et al. Crohn's Disease Activity and Concomitant Immunosuppressants Affect the Risk of Serious and Opportunistic Infections in Patients Treated With Adalimumab. *Am J Gastroenterol*. 2016 Dec 27;111(12):1806–15.
211. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1259–64.
212. Akuffo H, Costa C, van Griensven J, Burza S, Moreno J, Herrero M. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. Rafati S, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 May 10;12(5):e0006375.
213. Fu B, Lunt M, Galloway J, Dixon W, Hyrich K, Symmons D. A Threshold Hazard Model for Estimating Serious Infection Risk Following Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Biopharm Stat*. 2013 Mar 11;23(2):461–76.
214. Birnbaum R, Craft N. Innate immunity and Leishmania vaccination strategies. *Dermatol Clin*. 2011 Jan;29(1):89–102.
215. Marsden PD, Badaró R, Netto EM, Casler JD. Spontaneous clinical resolution without specific treatment in mucosal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 85(2):221.
216. Alimohammadian MH, Jones SL, Darabi H, Riazirad F, Ajdary S, Shabani A, et al. Assessment of Interferon- Levels and Leishmanin Skin Test Results in Persons Recovered for Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Jul 2;87(1):70–5.
217. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun*. 2000 Apr;68(4):1760–4.
218. Gaafar A, Kharazmi A, Ismail A, Kemp M, Hey A, Christensen CB, et al. Dichotomy of the T cell response to Leishmania antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clin Exp Immunol*. 1995 May;100(2):239–45.
219. Marcoval J, Penín RM, Sabé N, Valentí-Medina F, Bonfill-Ortí M, Martínez-Molina L. Cutaneous leishmaniasis associated with anti-tumour necrosis factor- α drugs: an emerging disease. *Clin Exp Dermatol*. 2017 Apr;42(3):331–4.

ANEXO I: Consentimiento informado

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION

ESTUDIO SOBRE EL IMPACTO DEL BROTE DE LEISHMANIASIS DEL SUROESTE DE MADRID EN LA POBLACION INMUNOSUPRIMIDA

Estudio sobre población en tratamiento con anti-TNF

Investigador Principal del Hospital de Fuenlabrada: Dr. Juan V. San Martín López

Co-investigador(es) del Hospital de Fuenlabrada: Dra. Belén Matía Hernando

En el Hospital Universitario de Fuenlabrada, igual que en la mayoría de hospitales, además de la asistencia a los pacientes, se realiza investigación biomédica. La finalidad de esta investigación es progresar en el conocimiento de las enfermedades y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Esta investigación biomédica requiere recoger datos clínicos y muestras biológicas de pacientes y donantes sanos para analizarlos y obtener conclusiones con el objetivo de conocer mejor las enfermedades y avanzar su diagnóstico y/o tratamiento.

Este documento tiene por objeto ofrecerle información sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Este estudio se está en el hospital de Fuenlabrada y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de dicho hospital.

Solicitamos su autorización para la participación en este estudio y para incorporar al Biobanco del hospital el material biológico sobrante de las pruebas que se le realicen durante el mismo en este centro, con el fin de que puedan ser utilizadas en investigación biomédica

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Vd. puede decidir no participar, o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin obligación de dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a la relación con su médico ni a la asistencia sanitaria a la que Vd. tiene derecho.

Siguiendo lo establecido por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos Personales, y sus normas de desarrollo, le solicitamos que lea detenidamente este documento de información y el consentimiento informado que se le adjunta al final para su firma, si está de acuerdo en participar en esta propuesta.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Recientemente se ha detectado un brote de una enfermedad infecciosa llamada Leishmaniasis en la ciudad de Fuenlabrada. La Leishmaniasis se adquiere por la picadura de un mosquito que inyecta un parásito (la *Leishmania*) en la sangre del ser humano. Tiene varias presentaciones clínicas, desde la forma cutánea hasta la visceral, que es la más grave y puede suponer una situación de riesgo vital. Se trata de una enfermedad rara sobre la que existe poca información por su poca frecuencia.

Este brote endémico es una oportunidad para un mejor estudio de esta enfermedad y valorar la necesidad de la prevención en pacientes de alto riesgo de padecer la enfermedad, como los pacientes que reciben tratamiento con fármacos inhibidores del TNF.

El fin de este estudio es intentar estimar la prevalencia de infección por *Leishmania* durante un brote epidémico y su evolución en pacientes que están recibiendo un tratamiento anti-TNF. Además, nos permitirá conocer distintos parámetros en sangre involucrados en la respuesta inmune a la infección para conocer mejor los factores predisponentes al desarrollo de la enfermedad. Este estudio representará la mayor recopilación de datos sobre esta enfermedad en pacientes y proporcionará datos sobre la presentación clínica, exámenes diagnósticos y respuesta inmune contra la *Leishmania* de valor incalculable.

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Vd. está invitado a participar porque está realizando un tratamiento puede conferir especial susceptibilidad a poder padecer dicha enfermedad, por lo que consideramos de especial interés, caracterizar la evolución de dicha enfermedad,

¿En qué consiste mi participación?

Si usted decide tomar parte en este estudio, éste no supondrá ninguna molestia adicional, ya que se incorporará en su analítica de control en el seguimiento que se realiza cada tres meses en la consulta.

¿Cuáles son los riesgos y molestias?

*Extracción de sangre: sacar sangre es incómodo y puede resultar doloroso, puede tener algunas complicaciones, como la aparición de un hematoma en la zona de punción que puede tardar unos días en desaparecer y más raramente complicarse con una infección local llamada flebitis.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que Vd. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la leishmaniasis. En el futuro, es posible que estos descubrimientos sean de utilidad para conocer mejor las enfermedades y quizás puedan beneficiar a personas como Vd., pero no se prevén aplicaciones inmediatas de ellos.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Vd. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

También podrá recibir los resultados de las pruebas que se le practiquen si así lo solicita. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los pacientes.

¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos?

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. En todo momento, Vd. podrá acceder a sus datos, corregirlos o cancelarlos.

Solo el equipo investigador y las autoridades sanitarias, que tienen deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se podrá

transmitir a terceros la información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa de nuestro país.

¿Qué ocurrirá con las muestras obtenidas?

Las muestras se extraerán en el Hospital de Fuenlabrada y serán codificadas. Esto quiere decir que poseen un código que se puede relacionar, mediante una información, con la identificación del donante. Esta información está a cargo del investigador principal y solo pueden acceder a ella los miembros del equipo investigador y las autoridades sanitarias en el ejercicio de sus funciones.

Una parte de las muestras (10cc) será enviada a la Unidad de Leishmaniasis del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III) donde se realizarán los estudios parasitológicos e inmunológicos pertinentes.

Si Vd. accede, el sobrante de las muestras (5cc) serán conservadas en el Biobanco del Hospital de Fuenlabrada, para uso en futuros estudios de investigación relacionados con el presente. Estos estudios deberán ser aprobados por un Comité de Ética de la Investigación oficialmente acreditado para su realización.

El responsable de la custodia de las muestras enviadas al Centro Nacional de Microbiología es el Dr. Francisco Javier Moreno Nuncio, jefe de la Unidad de Leishmaniasis de dicho centro. El responsable de las muestras conservadas en el Biobanco del Hospital de Fuenlabrada es el Dr. Ángel Castaño Pascual, director de dicho Biobanco.

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Vd. no será retribuido por participar.

Los investigadores no recibirán dinero por participar en el estudio.

¿Quién me puede dar más información?

Para más información puede contactar con el Dr. San Martín, Investigadora Principal del Hospital de Fuenlabrada, o con los co-investigadores (Dra. Matía Hernando) en el teléfono 916006186.

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina. De esta forma está usted colaborando a vencer las enfermedades y ayudar a multitud de enfermos actuales y futuros

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio de Investigación:
ESTUDIO SOBRE EL IMPACTO DEL BROTE DE LEISHMANIASIS DEL SUROESTE DE MADRID EN LA POBLACION INMUNOSUPRIMIDA
Estudio sobre población en tratamiento con anti-TNF

Investigador Principal del Hospital de Fuenlabrada: Dr. San Martín Tfno. 916006186

Co-investigador(es): Dra. Matía Tfno. 916006186

Nombre y apellidos del participante.....
DNI **Edad**.....

Persona del centro que informa
..... **DNI**.....

Si ha comprendido la información que se le ha proporcionado, ha resuelto cualquier duda que pudiese tener y decide colaborar con el Biobanco del Hospital Universitario de Fuenlabrada en los términos antes explicados, por favor, lea y firme a continuación esta hoja.

El abajo firmante autoriza su participación en el “ESTUDIO SOBRE EL IMPACTO DEL BROTE DE LEISHMANIASIS DEL SUROESTE DE MADRID EN LA POBLACION INMUNOSUPRIMIDA. Estudio sobre población en tratamiento con anti-TNF”. Además, autoriza al Hospital Universitario de Fuenlabrada a que el material biológico sobrante de las pruebas que se le han realizado o se le van a realizar como parte del mismo sean incorporadas en el Biobanco, y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Confirmando que:

1. Autorizo mi participación en el “ESTUDIO SOBRE EL IMPACTO DEL BROTE DE LEISHMANIASIS DEL SUROESTE DE MADRID EN LA POBLACION INMUNOSUPRIMIDA. Estudio sobre población en tratamiento con anti-TNF” o SI o NO

2. Autorizo que el excedente de material biológico utilizado para pruebas diagnósticas y la información clínica asociada se utilice para investigación en los términos recogidos en el Documento de Información al Donante o SI o NO

3. Deseo que se me comunique la información derivada de la investigación que realmente sea relevante y aplicable para mi salud o la de mi familia o SI o NO
Teléfono o E-mail de contacto.....

4. Autorizo a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales o SI o NO Teléfono o E-mail de contacto:.....

5. He expresado mi deseo de que se respeten las siguientes excepciones respecto al objetivo y métodos de las investigaciones:

.....
.....
.....
.....
.....

ANEXO I: Consentimiento informado

PARTICIPANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En

ANEXO II: Características de la muestra de 102 pacientes asintomáticos

		Frecuencia (n)	Porcentaje
Sexo Mujer		53	52%
Otra inmunodepresión		15	14.7%
	DM	12	11.7%
	Enolismo	1	0.98%
	TOS	2	1.96%
	Esplenectomía	1	0.98%
Nacionalidad extranjera*		8	7.8%
Enfermedad de base	AR	26	25.5%
	Psoriasis	13	12.7%
	APs	13	12.7%
	EA	30	29.4%
	EII	14	13.7%
	Otro**	6	5.9%
Status al reclutamiento	Pendiente de comenzar tratamiento (Inicio)	29	28.4%
	En tratamiento (Antiguo)	73	71.6%
Tratamiento en el momento del reclutamiento*** o tratamiento de inicio	Infliximab	14	13.7%
	Etanercept	25	24.5%
	Adalimumab	18	17.6%
	Certolizumab	27	26.5%
	Golimumab	17	16.7%
	Corticoides	12	11.8%
	Metotrexato	20	19.6%
Han recibido corticoides o metotrexato en los últimos 5 años		71	69.6%
Han recibido otro tratamiento biológico diferente en los últimos 5 años		27	26.5%
Cambio de tratamiento durante el seguimiento analítico		23	22.5%

	Media	SD
Edad (años)	49.27	12.85

	Mediana	Rango, RIQ
Distancia al parque (metros)	1175	123 - 22300, 1000

*Nacionalidades: Chile, Colombia, Ecuador (2), Perú (2), Rumanía (2) **Otros diagnósticos: Polimialgia reumática, espondiloartropatía indeterminada (4), uveítis ***Tiempo de tratamiento en los pacientes Antiguos (semanas): mediana 38, RIQ 91.25, rango 0-397