



## TESIS DOCTORAL

*Características clínicas, diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis visceral en pacientes adultos inmunocompetentes.*

*Leishmaniasis ganglionar como forma atípica de presentación.*

*Experiencia del brote epidémico de Fuenlabrada.*

Autor:

**Luis Horrillo Sánchez de Ocaña**

Director:

**Juan Víctor San Martín**

**Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud**

**Escuela Internacional de Doctorado**

2019



*A Iris y Lucas,  
causa y solución de todos mis desvelos.*



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>9</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>13</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>1. LEISHMANIASIS: CONCEPTOS Y DATOS GENERALES .....</b>	<b>19</b>
1.1 Parásito, vector y reservorio.....	19
1.2 Distribución geográfica y epidemiología .....	22
1.3 Formas clínicas.....	23
1.4 Factores de riesgo.....	25
1.5 Patogenia .....	26
1.6 Diagnóstico y Tratamiento.....	27
1.7 Marcadores de curación .....	28
<b>2. LEISHMANIASIS Y ADENOPATÍAS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO.....</b>	<b>30</b>
<b>4. LEISHMANIASIS EN NUESTRO MEDIO .....</b>	<b>32</b>
4.1 Brote epidémico en Fuenlabrada y Suroeste de la Comunidad de Madrid .....	33
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>Objetivo 1: Descripción del brote. Leishmaniasis visceral .....</b>	<b>39</b>
1.1. Descripción global del brote .....	39
1.2. Leishmaniasis visceral típica. Comparación con leishmaniasis visceral en inmunodeprimidos .....	39
1.3. Leishmaniasis visceral típica. Comparación con los casos anteriores al brote.....	40

<b>Objetivo 2: Presentación atípica. Leishmaniasis ganglionar .....</b>	<b>40</b>
1.1.    Leishmaniasis ganglionar (LLL) durante el brote. Comparación con leishmaniasis visceral típica (LV).....	40
1.2.    Leishmaniasis ganglionar (LLL). Descripción.....	40
<b>Objetivo 3: Marcadores de cura en leishmaniasis .....</b>	<b>40</b>
<b>MATERIAL y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
<b>Diseño.....</b>	<b>43</b>
<b>Población de Fuenlabrada.....</b>	<b>44</b>
<b>Muestra .....</b>	<b>45</b>
<b>Definiciones .....</b>	<b>46</b>
<b>Variables .....</b>	<b>47</b>
<b>Test realizados para diagnóstico de leishmaniasis durante el brote .....</b>	<b>48</b>
<b>Test realizados para estudio de biomarcadores .....</b>	<b>50</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>53</b>
<b>Financiación .....</b>	<b>54</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>OBJETIVO 1: DESCRIPCIÓN CLÍNICA DEL BROTE.....</b>	<b>57</b>
1.1.    DESCRIPCION GLOBAL.....	57
1.1.1.    Formas clínicas y distribución por años .....	57
1.1.2.    Características epidemiológicas.....	58
1.1.3.    Status inmunológico.....	59
1.2.    LEISHMANIASIS VISCERAL TÍPICA (LV). COMPARACIÓN CON LV EN INMUNODEPRIMIDOS.....	62
1.2.1.    Características clínicas y epidemiológicas .....	62
1.2.2.    Leishmaniasis visceral y adenopatías.....	65
1.2.3.    Leishmaniasis visceral y síndrome hemofagocítico .....	66
1.2.4.    Leishmaniasis visceral y autoinmunidad.....	70
1.2.5.    Diagnóstico.....	71
1.2.6.    Tratamiento y recidivas.....	72
1.2.7.    Tratamiento y efectos adversos.....	76
1.3.    LEISHMANIASIS VISCERAL TÍPICA (LV). COMPARACIÓN CON LOS CASOS ANTERIORES AL BROTE.....	77
<b>OBJETIVO 2: PRESENTACION ATÍPICA. LEISHMANIASIS GANGLIONAR.....</b>	<b>81</b>

2.1.	LEISHMANIASIS GANGLIONAR (LLL) DURANTE EL BROTE. COMPARACIÓN CON LEISHMANIASIS VISCERAL TÍPICA (LV).....	81
2.2.	LEISHMANIASIS GANGLIONAR (LLL). DESCRIPCIÓN.....	83
2.2.1	Distribución por años.....	83
2.2.2	Características clínicas de la leishmaniasis ganglionar.....	84
2.2.3	Diagnóstico de la leishmaniasis ganglionar.....	86
2.2.4	Tratamiento de la leishmaniasis ganglionar.....	87
	<b>OBJETIVO 3: MARCADORES CELULARES DE CURA EN LLL.....</b>	<b>89</b>
	<b><i>DISCUSIÓN</i>.....</b>	<b>91</b>
	<b>DESCRIPCIÓN CLÍNICA DEL BROTE. Leishmaniasis visceral en inmunocompetentes.....</b>	<b>93</b>
	Características epidemiológicas.....	94
	Status inmunológico.....	100
	Comparación con otras series.....	101
	Cuadro clínico de leishmaniasis visceral típica.....	104
	Síndrome hemofagocítico.....	106
	Autoinmunidad y otras serologías.....	111
	Diagnóstico.....	115
	Tratamiento y evolución.....	120
	Leishmaniasis visceral. Comparación con casos anteriores al brote.....	125
	<b>LEISHMANIASIS GANGLIONAR.....</b>	<b>127</b>
	Características epidemiológicas.....	128
	Cuadro clínico.....	129
	Diagnóstico.....	132
	Tratamiento y evolución.....	136
	Respuesta celular en LLL.....	137
	<b>Limitaciones de nuestro trabajo.....</b>	<b>139</b>
	<b><i>CONCLUSIONES</i>.....</b>	<b>141</b>
	<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i>.....</b>	<b>147</b>
	<b><i>APÉNDICES</i>.....</b>	<b>161</b>



## AGRADECIMIENTOS

Al Hospital Universitario de Fuenlabrada, que me formó como internista, y que me dio la oportunidad de aprender lo que significa investigar. Gracias a Jesús, por insistir machaconamente, y a Olga, Chema, Sonia, Jorge, y al resto de adjuntos del servicio de Medicina Interna, por su cercanía y capacidad docente. También a los servicios de Microbiología, Dermatología, Anatomía Patológica, y todos los involucrados en la investigación de este brote epidémico, por su necesaria contribución a esta tesis y por facilitarme datos e imágenes.

A la Unidad de Leishmaniasis del Centro Nacional de Microbiología-ISCIII, en especial a Eugenia y Javier, por la colaboración constante durante todos estos años, y por su ayuda con la bibliografía y redacción de las diferentes técnicas diagnósticas para el estudio de biomarcadores.

A mis compañeros de residencia y amigos. A Elena, con la que empecé este proyecto cuando era un tierno R1, y a Alicia y Belén, con las que lo terminé. A mis coerres Carmen e Iván, a María, Paula y todos mis residentes mayores y pequeños, que me ayudaron en el proceso de recogida de muestras y me hicieron más entretenidas las tardes de llamadas telefónicas y comprobación de historias, cuando ni siquiera imaginaba que habría un final.

A mi familia, la de cerca y la de lejos, porque nunca lo está. Por la ayuda incondicional y por permitirme sacar tiempo de donde no lo había.

A Bea, mi mejor compañera de viaje. Porque volveremos a viajar con nuestros pequeños compañeros. Por lo que has hecho y haces a diario por esta familia. Esta tesis también es tuya, porque sin tu ayuda no habría escrito una sola palabra. Gracias por llenar de música mi vida.

A Juan Víctor, esta obra es producto de tu generosidad y buen hacer, tanto profesional como humano. Gracias primero por enseñarme el camino, luego por acompañarme, y por último por haberme levantado cuando me parecía imposible continuar. Y por haberme animado en todo momento con una sonrisa. Y con una postdata.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>ABCL:</b>	Anfotericina B complejo lipídico.
<b>ABL:</b>	Anfotericina B liposomal.
<b>ANA:</b>	Anticuerpos antinucleares.
<b>CNM:</b>	Centro Nacional de Microbiología.
<b>EDO:</b>	Enfermedad de declaración obligatoria.
<b>ELISA:</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).
<b>Hb:</b>	Hemoglobina.
<b>HLH:</b>	Linfocitosis hemofagocítica, o síndrome hemofagocítico.
<b>HUF:</b>	Hospital Universitario de Fuenlabrada.
<b>IC:</b>	Inmunocompetentes.
<b>ID:</b>	Inmunodeprimidos.
<b>IFI:</b>	Inmunofluorescencia indirecta.
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferón gamma.
<b>IL:</b>	Interleucina o interleuquina.
<b>ISCIH:</b>	Instituto de Salud Carlos III
<b>LC:</b>	Leishmaniasis cutánea.
<b>LES:</b>	Lupus eritematoso sistémico.
<b>LM:</b>	Leishmaniasis mucosa.
<b>LV:</b>	Leishmaniasis visceral.

<b>LLL:</b>	Leishmaniasis ganglionar.
<b>NNN:</b>	Novy-McNeal-Nicoll.
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>PAAF:</b>	Punción aspiración con aguja fina.
<b>PBMC:</b>	Peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares de sangre periférica).
<b>PBS:</b>	Phosphate buffered saline (tampón fosfato salino).
<b>PCR:</b>	Proteína C reactiva.
<b>PCR:</b>	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).
<b>SIDA:</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
<b>SLA:</b>	Soluble leishmania antigen (antígeno soluble de <i>Leishmania</i> ).
<b>SLA-CPA:</b>	Soluble leishmania antigen – cell proliferation assay (test de proliferación celular tras estimulación con antígeno soluble de <i>Leishmania</i> ).
<b>TAC:</b>	Tomografía axial computerizada.
<b>TARGA:</b>	Tratamiento antirretroviral de gran actividad.
<b>TGF-β:</b>	Factor de crecimiento transformante beta.
<b>VIH:</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana.
<b>VSG:</b>	Velocidad de sedimentación globular.
<b>WHO:</b>	World Health Organisation (Organización Mundial de la Salud).

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies de <i>Leishmania</i> en humanos.....	20
<b>Tabla 2.</b> Criterios diagnósticos del Síndrome Hemofagocítico o HLH.....	47
<b>Tabla 3.</b> Características clínicas de todos los pacientes atendidos en función de su estatus inmunológico.....	60
<b>Tabla 4.</b> Características clínicas de los pacientes con LV (excluidos LLL y LM) en función de su estatus inmunológico.....	62
<b>Tabla 5.</b> Presencia de criterios HLH entre los pacientes con LV, en función de su estatus inmunológico.....	66
<b>Tabla 6.</b> Pacientes con LV según el número de criterios de HLH que cumplen, en función de su estatus inmunológico.....	68
<b>Tabla 7.</b> Pacientes con LV que cumplen los criterios de HLH, en función de si son de raza negra o no.....	69
<b>Tabla 8.</b> Pacientes con LV que presentaron positividad para otros estudios de inmunidad, en función de su estatus inmunológico.....	70
<b>Tabla 9.</b> Pruebas diagnósticas realizadas a los pacientes con LV en función del estatus inmunológico.....	71
<b>Tabla 10.</b> Falsos positivos de la serología.....	72
<b>Tabla 11.</b> Dosis y evolución clínica de los pacientes con LV típica, en función de su status inmunológico y tipo de inmunodepresión.....	73
<b>Tabla 12.</b> Características de los pacientes IC que recidivaron.....	74

<b>Tabla 13.</b> Características epidemiológicas, clínicas, resultados de laboratorio y pruebas diagnósticas de todos los pacientes con LV, comparando los casos anteriores con los del brote epidémico.....	78
<b>Tabla 14.</b> Características clínicas, epidemiológicas, resultados de laboratorio, test diagnósticos, tratamiento inicial y respuesta de los pacientes comparando LV típica con LLL.....	82
<b>Tabla 15.</b> Dosis de tratamiento (ABL) y evolución de los pacientes con LLL.....	87
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de resultados positivos en test parasitológicos, serológicos e inmunológicos en pacientes con leishmaniasis activa (A) y curada (C).....	89

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	21
<b>Figura 2.</b> Estado de endemicidad de la leishmaniasis visceral en todo el mundo, año 2015.....	23
<b>Figura 3.</b> Países endémicos para LV en la Región Europea de la OMS.....	32
<b>Figura 4.</b> Tasas de leishmaniasis. EDO. Comunidad de Madrid. Años 2007-2016.....	35
<b>Figura 5.</b> Pacientes con leishmaniasis no cutánea atendidos en el Hospital Universitario de Fuenlabrada desde el inicio del brote epidémico.....	57
<b>Figura 6.</b> Distribución de los pacientes atendidos con leishmaniasis en función de su edad.....	58
<b>Figura 7.</b> Pacientes extranjeros atendidos según su país de origen.....	59
<b>Figura 8.</b> Distribución de los pacientes según su estatus inmunológico y tipo de inmunodepresión.....	59
<b>Figura 9.</b> Síntomas referidos por los pacientes con LV, y porcentaje de pacientes que los presentaron.....	64
<b>Figura 10.</b> Valores de ferritina ( $\mu\text{g/L}$ ) de todos los pacientes inmunocompetentes con LV.....	67
<b>Figura 11.</b> Valores medios de ferritina ( $\mu\text{g/L}$ ) según estatus inmunológico y tipo de inmunodepresión.....	67
<b>Figura 12.</b> Días de retraso en el diagnóstico (mediana y rango intercuartílico) antes y después de la utilización del test rápido rk-39-ICT.....	79

<b>Figura 13.</b> Pacientes con LLL atendidos por año de diagnóstico.....	83
<b>Figura 14.</b> Pacientes con LLL en función de su grupo de edad.....	84
<b>Figura 15.</b> Localización de adenopatías en los pacientes con LLL.....	85
<b>Figura 16.</b> Outcome del tratamiento de los pacientes con LLL.....	88
<b>Figura 17.</b> Comparación de la respuesta linfoproliferativa a SLA de PBMCs (SLA-CPA) y de IFN-gamma en pacientes enfermos y curados de LLL.....	89
<b>Figura 18.</b> Brote comunitario de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. 2009-2015. Curva epidemiológica según forma de presentación, por mes de inicio de síntomas (julio-2009-junio 2014).....	94
<b>Figura 19.</b> Distribución por edades de los pacientes con LV durante el brote epidémico.....	97
<b>Figura 20.</b> Pirámide poblacional de Fuenlabrada en 2011.....	98
<b>Figuras 21.</b> Pirámides poblacionales de India (A), Etiopía (B) y Brasil (C) en 2016.....	102
<b>Figura 22.</b> Amastigotes de <i>Leishmania</i> en el interior de un macrófago, en un aspirado de médula ósea de uno de nuestros pacientes.....	118
<b>Figura 23.</b> Propuesta de algoritmo diagnóstico de LV en paciente inmunocompetente basada en la experiencia durante el brote epidémico de Fuenlabrada.....	120
<b>Figura 24.</b> Linfadenitis granulomatosa no necrotizante, con parásitos de <i>L.infantum</i> en uno de nuestros pacientes con LLL.....	135

# INTRODUCCIÓN



## 1. LEISHMANIASIS: CONCEPTOS Y DATOS GENERALES

Ha pasado más de un siglo desde que William Leishman describiera por primera vez, entre las células esplénicas de un soldado fallecido en la India por un cuadro febril de larga evolución, “una gran cantidad de pequeños cuerpos redondeados u ovalados de 2 a 3 micras de diámetro, diferente a todo lo descrito hasta entonces” (1), y el parasitólogo Ronald Ross bautizara ese nuevo género de parásito como *Leishmania donovani* (2) (en honor también a Charles Donovan, quien confirmó los mismos hallazgos de forma paralela en otros tres pacientes). En este tiempo se ha conocido mucho acerca de este parásito y la enfermedad que provoca, la leishmaniasis, una zoonosis de distribución mundial y con una elevada morbimortalidad. Sin embargo, no parece que se haya avanzado ni invertido lo suficiente en investigación y tratamientos como para evitar que esta enfermedad continúe haciendo estragos en diferentes partes del mundo, siendo una de las más destacadas de las denominadas por la OMS “Neglected Diseases”, o enfermedades desatendidas (3).

### 1.1 Parásito, vector y reservorio

Hoy en día se conocen más de 20 especies diferentes de *Leishmania*, que se pueden clasificar de diversas formas, aunque clásicamente se han dividido en función de la región del mundo en la que se pueden encontrar y de su tropismo hacia un tipo de afectación concreta, como se observa en la siguiente tabla:

***Leishmania* found in humans**

Subgenus	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Old World	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> <sup>a</sup> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
New World	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <sup>a</sup> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <sup>a</sup> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> <sup>b</sup>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic	Mucotropic

<sup>a</sup> Species status is under discussion

<sup>b</sup> Taxonomic position is under discussion

Tabla 1. Especies de *Leishmania* en humanos. (Extraída del documento Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010)(3).

En cuanto al vector, los flebotominos (*Phlebotominae*) o “moscas de la arena” son insectos dípteros distribuidos ampliamente por el globo terráqueo, comprendiendo alrededor de 800 especies y subespecies, de las que más de 90 se consideran vectores probables de *Leishmania* spp (3)(4). En el Viejo Mundo estos insectos pertenecen al género *Phlebotomus*, mientras que en el Nuevo Mundo pertenecen al género *Lutzomyia*. En ambos casos se caracterizan por presentar las hembras hábitos hematofágicos, en su caso necesario para poder desarrollar los huevos, y siendo así responsables de la transmisión del parásito. Son de pequeño tamaño (entre 1-4 mm), se mueven dando pequeños saltos y su actividad picadora es generalmente en horas crepusculares y nocturnas. Pueden reproducirse en gran variedad de lugares,

generalmente húmedos y oscuros (en grietas de paredes o rocas, en cuevas, madrigueras de animales, entre la hojarasca húmeda de los bosques, los hoyos en el suelo, nidos de aves, termiteros...) (5), y pueden alimentarse en el interior o al aire libre dependiendo de la especie. Todo este conocimiento resulta de gran importancia pensando en la enfermedad y los posibles métodos de control de la misma.

Hay unas 70 especies animales, entre ellas el hombre, que son reservorios naturales de *Leishmania*. La más conocida en España es el perro (6).

Debido a un proceso de co-evolución, existe una asociación entre la especie de *Leishmania*, su reservorio animal (huésped) y la especie de flebotomino involucrado en la transmisión de la leishmaniasis(3)(5), aunque en todos los casos el ciclo del parásito se puede resumir en el siguiente gráfico:

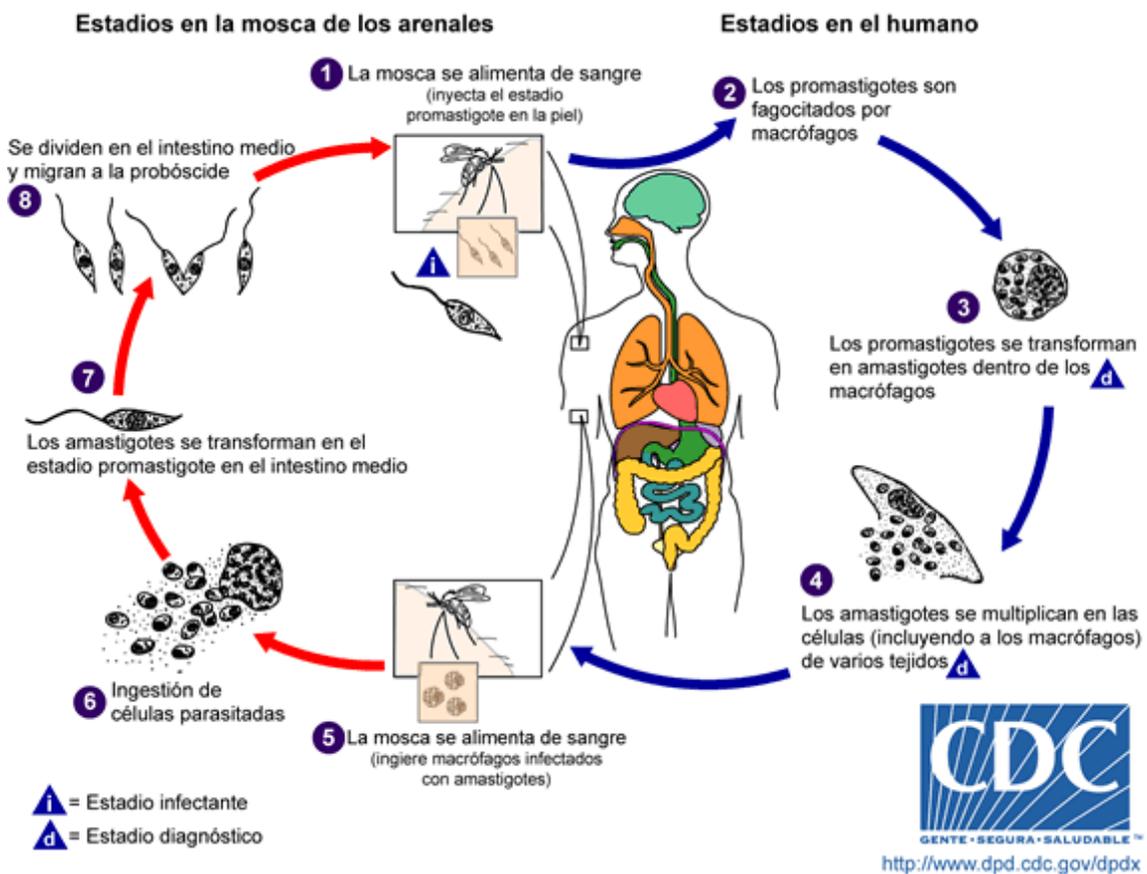


Fig. 1. Ciclo de vida de *Leishmania* (extraído de la página web pública del Center for Disease Control (CDC).

## **1.2 Distribución geográfica y epidemiología**

Resulta difícil hacer un cálculo de la población verdaderamente afectada por la enfermedad debido a que, hasta hace pocos años, el impacto sobre la salud pública de la leishmaniasis ha sido claramente infraestimado. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (fuente: página web [www.who.int](http://www.who.int)), la leishmaniasis es actualmente una enfermedad endémica en 88 países. En los últimos 10 años, las regiones endémicas se han extendido y ha habido un gran aumento en el número de casos, aunque el hecho de que solo en 32 de los 88 países afectados sea obligatoria la declaración de los casos de la enfermedad dificulta la recogida de los datos. Se estima que se producen unos 2 millones de nuevos casos anuales de leishmaniasis (de los que medio millón son en su forma de presentación más grave, la leishmaniasis visceral), con alrededor de 12 millones de personas actualmente infectadas, y con más de 350 millones de personas en riesgo, entre ellos los países de la cuenca mediterránea (3). En 2015, más del 90% de los nuevos casos descritos ocurrieron en 7 países: Brasil, Etiopía, India, Somalia, Kenia, Sudán del Sur y Sudán. Se estima que es responsable de entre 20000 y 40000 muertes anuales (7).

En la Figura 2 podemos observar los datos de endemicidad de la leishmaniasis visceral en 2015.

## Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015

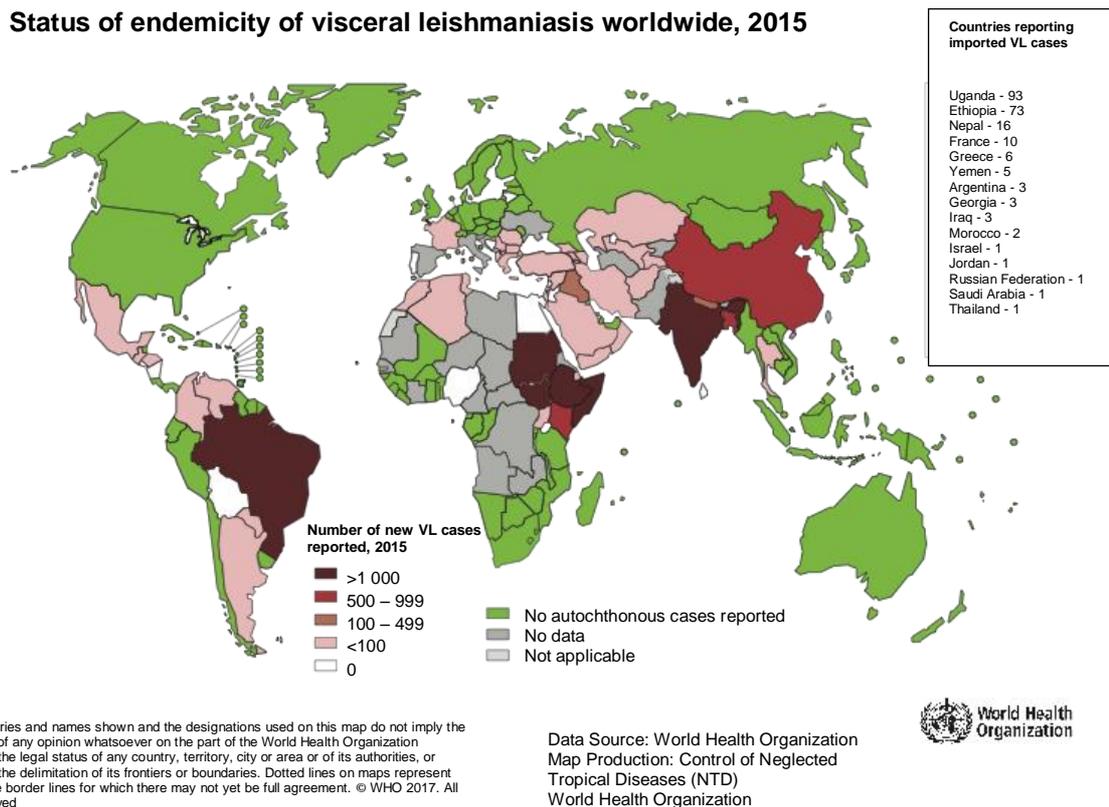


Fig. 2. Estado de endemicidad de la leishmaniasis visceral en todo el mundo, año 2015. (Fuente [www.who.int](http://www.who.int))

La epidemiología de la leishmaniasis va a depender, por tanto, de las características de la especie del parásito predominante en cada región, las características ecológicas de dicha zona, la exposición previa y actual de la población humana al parásito y de sus pautas de comportamiento. A su vez, las variaciones que se produzcan en estas características pueden provocar cambios en la epidemiología, con aparición de casos autóctonos en lugares donde previamente no estaba descrita la enfermedad (8).

### 1.3 Formas clínicas

Hay que aclarar que la mayoría de las personas infectadas por el parásito no desarrollan ningún tipo de síntoma a lo largo de su vida(9). Por tanto, el término leishmaniasis se refiere al hecho de presentar sintomatología de la enfermedad a

causa de la infección, y no al mero hecho de estar infectado(3). De acuerdo con este posible cuadro clínico, existen tres tipos de leishmaniasis: visceral, cutánea y mucocutánea.

La leishmaniasis visceral (LV), también conocida como Kala-azar, es la forma clínica más grave de esta enfermedad, y es producida por las especies *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*. El periodo de incubación de la leishmaniasis visceral es variable y puede oscilar desde una semana a varios meses. Los signos clínicos característicos de la enfermedad son los episodios irregulares de fiebre, la pérdida de peso, y la esplenomegalia. En ausencia de tratamiento adecuado el cuadro evoluciona hacia la caquexia, conduciendo en unos meses a la muerte (3). La afectación puede ser endémica, esporádica o epidémica, con diferentes características según el caso. En áreas endémicas la enfermedad tiende a ser crónica, y afecta fundamentalmente a niños. Es endémica en el subcontinente indio y África oriental donde, junto con Brasil, se dan actualmente la mayoría de los casos (Figura 2).

La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma más frecuente y leve de la enfermedad. La pueden producir la mayoría de especies conocidas de *Leishmania* que afectan a los humanos, tanto en el Viejo como Nuevo Mundo (Tabla 1). Se trata de lesiones cutáneas, principalmente ulcerosas, en las zonas expuestas del cuerpo (donde se produce la picadura del vector), que pueden dejar cicatrices de por vida y ser causa de discapacidad grave. Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniasis cutánea se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central.

La leishmaniasis mucocutánea conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta (sobre todo mucosa laríngea).

Generalmente se incluye en este grupo la presentación cutánea difusa producida por *L. aethiopica* (muy frecuente en Etiopía), y también puede darse algún caso de afectación mucosa en Europa y la cuenca mediterránea por cualquiera de las especies de *Leishmania* autóctona. Sin embargo el término se aplica correctamente solo como enfermedad del Nuevo Mundo, que es causada por *L. braziliensis* y *L. panamensis* (ambas especies del subgénero *Viannia*) y se producen en Brasil, Bolivia y Perú (3).

Aparte de estas tres formas clínicas, existe la leishmaniasis dérmica post kala-azar, que es una secuela de la leishmaniasis visceral. Se caracteriza por una erupción macular, papular o nodular localizada habitualmente en la cara, los brazos, el tronco y otras partes del cuerpo. Esta forma se encuentra principalmente en África oriental y el subcontinente indio, donde hasta el 50% y el 10%, respectivamente, de los pacientes con kala-azar manifiestan la enfermedad. La leishmaniasis dérmica post kala-azar generalmente aparece entre seis meses y un año o varios años después de la curación aparente del kala-azar, aunque también puede presentarse antes (3).

#### **1.4 Factores de riesgo**

La enfermedad, que afecta mayoritariamente a las poblaciones más pobres del planeta, está asociada a la malnutrición, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda, la debilidad del sistema inmunitario y la falta de recursos (10).

Estas malas condiciones, como la ausencia de sistemas de gestión de residuos, pueden promover el desarrollo de los lugares de cría y reposo de los flebotomos y aumentar su acceso a la población humana. Los flebotomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre. Las pautas de comportamiento humano (por ejemplo, dormir a la intemperie o en el suelo) también

es probable que aumenten el riesgo. El uso de mosquiteros tratados con insecticida reduce el riesgo (5).

Los pacientes con inmunodepresión tienen mayor riesgo de desarrollar una leishmaniasis visceral, fundamentalmente los pacientes con infección crónica por VIH (11)(12), los pacientes trasplantados (13) y los pacientes con terapias biológicas (14)(15), en los que las manifestaciones clínicas pueden ser diferentes (16).

La leishmaniasis también está vinculada a los cambios ambientales, como la deforestación, la construcción de presas, los sistemas de riego y la urbanización. De la misma manera el cambio climático puede tener efectos importantes en la enfermedad, tanto por afectación de los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución, como en el propio ciclo del parásito. Las sequías, las hambrunas y las inundaciones que se producen como consecuencia del cambio climático pueden llevar a desplazamientos masivos de personas no inmunizadas hacia zonas de transmisión de la leishmaniasis (17), y la desnutrición puede debilitar la inmunidad de las poblaciones afectadas (18)(19).

### **1.5 Patogenia**

Aún no se conocen con exactitud los complejos mecanismos inmunológicos que se producen en el momento en que se inocular el parásito, aunque en general se acepta que el control de *Leishmania* dentro del huésped está mediado por respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas (3). Estas dependen de varios factores, entre ellos la especie de parásito implicado o la ya comentada malnutrición, e implican en última instancia que el huésped sea capaz de controlar la infección, ya sea eliminando el parásito o controlándolo en el punto de inoculación (manifestándose como una LC),

o por el contrario que se disemine por el organismo desarrollando una LV. Para ello es fundamental la actividad de los linfocitos T CD4+ (*helper*) y, aunque las razones por las que se produce una u otra respuesta no quedan claras, sí se conoce la implicación de determinadas citoquinas relacionadas con una respuesta inmune T-helper1 o T-helper2. En modelos murinos se ha comprobado que la ausencia de citoquinas como la IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  (implicadas en una respuesta Th1 o celular, que induce la actividad leishmanicida de los macrófagos) favorece la diseminación de la enfermedad (20)(21), mientras que en la LV sí se producen una gran cantidad de anticuerpos contra *Leishmania*, ineficaces y que no confieren protección, junto con un aumento en la síntesis de TGF- $\beta$  e IL-10, todo ello propio de una respuesta Th2 o humoral (22).

De forma muy simplificada podríamos pensar que una respuesta celular adecuada tipo Th1 confiere protección frente a *Leishmania*, y una respuesta Th2 favorece la diseminación (en un mecanismo similar al que se produce en la tuberculosis) pero es importante tener en cuenta que la dicotomía estricta de Th1 y Th2 en muchos modelos experimentales murinos no se refleja tan claramente en la leishmaniasis humana, en la que a menudo se observa una imagen mixta mucho más compleja (3).

## **1.6 Diagnóstico y Tratamiento**

El diagnóstico de la leishmaniasis visceral se basa en criterios clínicos y criterios microbiológicos que incluyen la demostración del parásito, bien por visualización del mismo, por cultivo o por PCR en muestras obtenidas en extensión de médula ósea, bazo, hígado o ganglios linfáticos; o por serología (3). Las pruebas serológicas tienen un valor bastante limitado en las leishmaniasis cutánea y mucocutánea. En el caso de

la leishmaniasis cutánea, el diagnóstico se confirma cuando los análisis parasitológicos corroboran las manifestaciones clínicas.

En cuanto al tratamiento de la leishmaniasis, éste viene determinado por la especie del parásito, la forma de presentación clínica, la región del mundo y la situación inmunológica del huésped (3). Estos tratamientos van desde los ya clásicos antimoniales pentavalentes, eficaces, aunque mal tolerados, aun así de primera elección en gran parte del mundo, y la paromomicina y miltefosina más recientes, pasando por los complejos de anfotericina, mejor tolerados aunque mucho más caros, y que son de elección en nuestro medio.

### **1.7 Marcadores de curación**

Aunque el tratamiento de la leishmaniasis normalmente es efectivo, las recidivas son relativamente frecuentes, sobretodo en pacientes inmunodeprimidos (23), lo que implica que el tratamiento por sí solo no es capaz de eliminar el parásito del organismo, requiriendo de un sistema inmunitario competente para ello. No existe actualmente un biomarcador que pueda identificar los pacientes verdaderamente “curados” (esto es, sin parásitos en el organismo), tras el tratamiento. Actualmente la confirmación de curación, tanto en LV como en LC, aún se basa en la ausencia de sintomatología tras 6 meses de seguimiento (3), siendo común que las recaídas ocurran bastante tiempo después de la finalización del tratamiento (24).

En pacientes inmunocompetentes con LV, una respuesta exitosa al tratamiento depende, como hemos comentado, de la activación de un subconjunto Th1 de linfocitos T CD4+ específicos para *Leishmania*, que producen un aumento de determinadas citoquinas. Entre ellas destaca el IFN- $\gamma$ , que no solo favorece la

activación de los macrófagos aumentando su capacidad fagocitaria, sino que retroalimenta esta respuesta haciendo que las células indiferenciadas CD4+ (Th0) se diferencien en Th1(25). Es por ello que la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) tras estimulación con antígeno soluble de *Leishmania* (el test SLA-CPA) (26)(27), y el aumento en la secreción de IFN- $\gamma$  por estas células (28)(29), proporcionan marcadores in vitro que podrían ser utilizados para evaluar la respuesta temprana al tratamiento. De hecho, este test de proliferación celular ya se ha mostrado como un indicador útil de la existencia de clones de células T de memoria específicas de *Leishmania* en pacientes VIH+, suficientes como para mantener la infección bajo control y evitar recidivas de LV (30). El valor del IFN- $\gamma$  en la monitorización de la respuesta inmune celular también se ha descrito previamente en la LV causada por *L. infantum* (31)(32)(33).

## **2. LEISHMANIASIS Y ADENOPATÍAS**

Aunque no es algo característico de la leishmaniasis, las adenopatías pueden acompañar a cualquiera de las formas clínicas de la enfermedad. Ciertamente, dependiendo del tipo de parásito y la región donde se transmite, se han descrito con mayor o menor frecuencia. Las adenopatías satélites pueden ser relativamente frecuentes en la leishmaniasis cutánea. En la zona noreste de Brasil, por ejemplo, la leishmaniasis cutánea por *Leishmania (Viannia) braziliensis* se acompaña de adenopatías de forma prácticamente constante (34)(35). La presencia de adenopatías

en el contexto de la leishmaniasis visceral, en cambio, no es frecuente en las series publicadas salvo que coexistan otras enfermedades o inmunosupresión profunda, especialmente VIH (36)(37), con la excepción de LV en Sudán del Sur (17) y Etiopía (38)(39), donde la especie causante es *L. donovani* y se ha descrito presencia de adenopatías en este contexto hasta en el 84% de los pacientes.

La presencia de adenopatías como única manifestación de leishmaniasis, referida como linfadenitis por *Leishmania* o leishmanial localized lymphadenopathy (LLL), se ha descrito con *L. major* (40) aunque poniéndola en relación con la LC, y de forma aislada en el sur de Europa (41), siendo considerado como una presentación excepcional de LV por *L. infantum*. Por el contrario, la LLL sí se ha descrito de forma más frecuente en Irán, donde la especie responsable es *L. tropica*, habitual causante de LC, aunque en este caso sí es considerado un síndrome de localización exclusiva ganglionar, como una condición autolimitada y que no requiere tratamiento(42)(43).

### **3. SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO**

El síndrome hemofagocítico o linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH en sus siglas en inglés) es un grave trastorno inmunológico causado por una desproporcionada elevación de citoquinas en sangre en respuesta a una activación descontrolada de linfocitos T, células NK y macrófagos. El HLH no es una enfermedad en sí misma, sino más bien la consecuencia de una incapacidad que puede ser hereditaria o adquirida del sistema inmune para enfrentarse a un determinado desencadenante, que en muchos casos es un agente infeccioso (44). Este antígeno

determinado acaba provocando en el organismo una respuesta inmune exagerada pero ineficaz, que se caracteriza clínicamente por, entre otros signos y síntomas, fiebre elevada, hepatoesplenomegalia y pancitopenia, y acaba siendo fatal en un gran porcentaje de pacientes. Entre los hallazgos de laboratorio más habituales destacan la hiperferritinemia, la hipertrigliceridemia, la elevación de transaminasas y la hipofibrinogenemia.

Descrito por primera vez por Scott y Robb-Smith en 1939 (45), no fue hasta 1979 cuando Risdall et al. caracterizaron este síndrome adecuadamente y su asociación con infecciones, tanto víricas como bacterianas (46) distinguiéndolo a su vez de las histiocitosis malignas, aunque también se pueda asociar con linfomas y trastornos hematológicos. De hecho, las condiciones subyacentes que predisponen a la HLH, abarcan tumores malignos, enfermedades autoinflamatorias y autoinmunes, enfermedades metabólicas e inmunodeficiencias adquiridas como el SIDA, la inmunosupresión iatrogénica y el trasplante de órganos o células madre (44). El HLH se puede presentar en cualquier grupo de edad. Incluso las formas genéticas, que antes se pensaba que estaban restringidas a los niños, ahora se reportan con mayor frecuencia también en adultos. Los criterios diagnósticos fueron re-definidos en 2004 por el Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Study Group (47) e incluyen, a falta de trastornos genéticos, criterios tanto clínicos como de laboratorio.

El tratamiento del síndrome hemofagocítico se fundamenta en pautas quimioterápicas protocolizadas, aunque puede representar una excepción cuando es secundario a la leishmaniasis visceral, ya que el tratamiento antiinfeccioso suele resolver las alteraciones por sí mismo (48). Ciertamente, en los últimos años este raro síndrome está adquiriendo cada vez mayor protagonismo dada su asociación con

enfermedades infecciosas potencialmente tratables y, entre ellas, una de las más frecuentes es la leishmaniasis visceral. Aunque la prevalencia de HLH asociada con LV es desconocida, hasta hace poco se consideraba una complicación poco común.

#### 4. LEISHMANIASIS EN NUESTRO MEDIO

En Europa y en toda la cuenca mediterránea la leishmaniasis es endémica, y la especie de parásito responsable de la transmisión es *L. infantum*, cuyo reservorio fundamental es el perro.

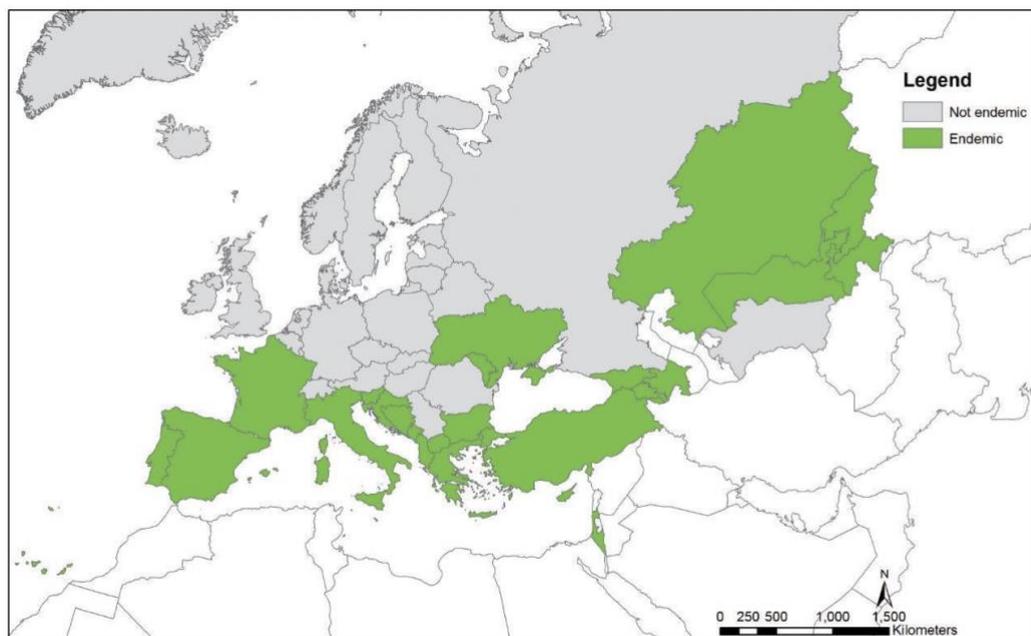


Fig. 3. Países endémicos para LV en la Región Europea de la OMS (data source and map production: WHO Regional Office for Europe, 2014). Extraído del documento *Manual on case management and surveillance of the leishmaniases in the WHO European region*(49).

Ya hemos comentado que *L. infantum* puede producir tanto leishmaniasis visceral como, a diferencia de la otra especie viscerotrópica, *L. donovani*, también leishmaniasis cutánea. En nuestro medio también podemos encontrar casos

importados, fundamentalmente de América y África oriental, aunque de forma muy esporádica (49).

A diferencia de otras regiones endémicas, en las que la leishmaniasis visceral afecta mayoritariamente a niños, desde la aparición de la infección por el VIH y el aumento del uso de la inmunosupresión para el trasplante y la quimioterapia, aproximadamente la mitad de los casos en Europa afectan a adultos (3).

En teoría cualquiera de los tratamientos conocidos ya comentados se podría emplear, dada la escasa descripción de resistencias en nuestro medio. Es cierto que la paromomicina y la miltefosina más recientes, aunque eficaces en otras regiones del mundo, apenas se han utilizado en Europa y aún no han demostrado claramente su eficacia en nuestro medio. Por ello, y aunque la posibilidad de resistencia a la anfotericina B liposomal se podría sospechar en algunas circunstancias, como en los casos de inmunosupresión severa con múltiples recidivas, por el momento no se ha documentado y continúa siendo el tratamiento de elección dada su menor toxicidad. La pauta más recomendada es la de 3-5 mg/Kg/día, administrados en infusión intravenosa durante 3-6 días, hasta una dosis total de entre 18 y 21 mg/Kg (49).

#### **4.1 Brote epidémico en Fuenlabrada y Suroeste de la Comunidad de Madrid**

En la Comunidad de Madrid, a la que pertenece la ciudad de Fuenlabrada, existe una Red de Vigilancia Epidemiológica que recoge todos los casos notificados de leishmaniasis visceral. Desde 2000 a 2009, se declararon entre 12 y 15 casos anuales en nuestra región con una incidencia anual de 0.5 por 100000 habitante (50). Sin embargo, desde finales de 2009 se produjo un notable aumento de casos confirmándose la existencia de un brote epidémico de leishmaniasis en el suroeste de

Madrid y principalmente en la ciudad de Fuenlabrada (51). Dicho brote presentó como peculiaridades que la especie causante fue un genotipo de *L. infantum* desconocido hasta la fecha (ITS-LOMBARDI) (52) y el reservorio fundamental la liebre, no descrito hasta la actualidad (53).

Según los datos del último Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid publicado sobre Enfermedades de Declaración Obligatoria (54), desde el inicio del brote comunitario, en julio de 2009, hasta diciembre de 2016, se han notificado un total de 716 casos asociados al brote: 6 casos (0,8%) con inicio de síntomas en 2009, 97 casos (13,5%) en 2010, 197 casos (27,5%) en 2011, 160 casos (22,4%) en 2012, 92 casos (12,9%) en 2013, 95 casos (13,3%) en 2014, 46 casos (6,4%) en 2015 y 23 casos (3,2%) en 2016. Los casos residían en cuatro municipios colindantes de la zona suroeste de la Comunidad de Madrid: 549 casos en Fuenlabrada (76,7%), 81 casos en Leganés (11,3%), 72 casos en Getafe (10,1%) y 14 casos en Humanes de Madrid (1,9%).

En la investigación del entorno de los casos se encontró la presencia de perros en el 27,4% de casos, de perros enfermos en el 2,9% (independientemente del diagnóstico), hábitats de mosquitos en el 26,8%, de explotaciones ganaderas en el 2,8% y de escombreras en el 2,9%.

Aunque se han tomado medidas para disminuir el número de vectores y reservorios en la zona (51), logrando que la tasa de incidencia de leishmaniasis haya descendido en los últimos años (Figura 4), la investigación epidemiológica y ambiental del brote comunitario en la zona suroeste continúa abierta tras finalizar el año 2017.

Tasa por 100.000

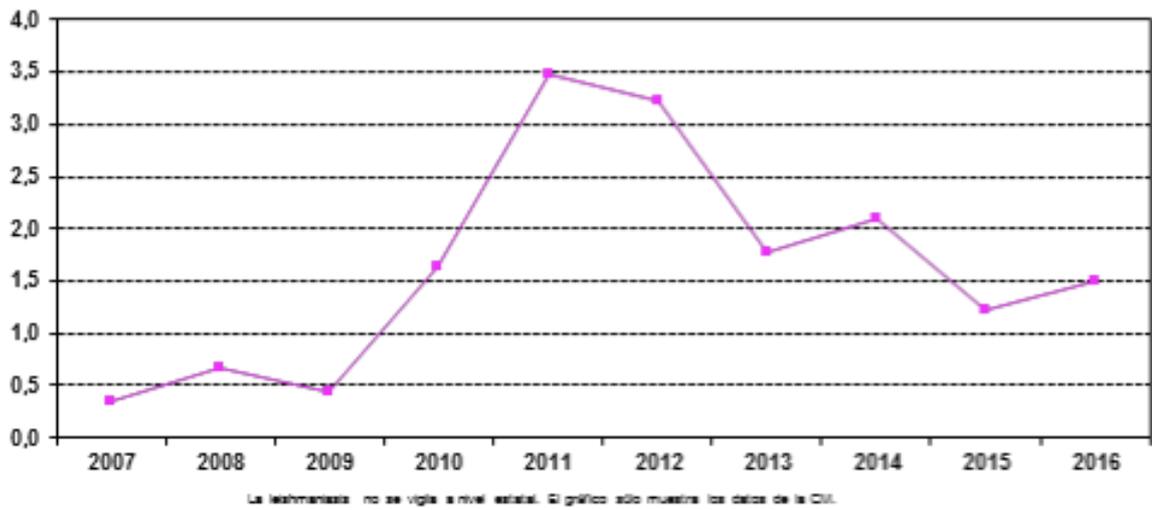


Fig. 4. Tasas de leishmaniasis. EDO. Comunidad de Madrid. Años 2007-2016. (extraída del Boletín epidemiológico de la Comunidad de Madrid, Nº 11. Volumen 23. Noviembre 2017) (54)



## OBJETIVOS



Nuestro objetivo principal es mostrar nuestra experiencia en el manejo hospitalario (características clínicas, diagnóstico y tratamiento) de los pacientes con leishmaniasis atendidos en el Hospital Universitario de Fuenlabrada en el contexto del mayor brote de leishmaniasis descrito en Europa hasta la fecha, con especial atención a los pacientes inmunocompetentes.

## **Objetivo 1: Descripción del brote. Leishmaniasis visceral**

### **1.1. Descripción global del brote**

Se describen las características epidemiológicas y clínicas de todos los pacientes adultos con leishmaniasis de nuestro centro, con especial atención a las formas de presentación de la leishmaniasis (visceral, cutánea, ganglionar y mucosa) y las diferencias entre los pacientes inmunocompetentes y los inmunodeprimidos de toda la cohorte.

### **1.2. Leishmaniasis visceral típica. Comparación con leishmaniasis visceral en inmunodeprimidos**

Se describen las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral de nuestra cohorte. Se presentan las diferencias con los pacientes inmunodeprimidos con leishmaniasis visceral. Se desarrollan las relaciones de la asociación de la leishmaniasis visceral con el síndrome hemofagocítico y con la autoinmunidad. Se describen además los métodos diagnósticos y el tratamiento de nuestros enfermos, analizando las recidivas y sus causas.

### **1.3. Leishmaniasis visceral típica. Comparación con los casos anteriores al brote**

Se comparan las diferencias epidemiológicas, clínicas, diagnóstico y tratamiento de los pacientes con leishmaniasis antes y después del brote.

## **Objetivo 2: Presentación atípica. Leishmaniasis ganglionar**

### **1.1. Leishmaniasis ganglionar (LLL) durante el brote. Comparación con leishmaniasis visceral típica (LV)**

Se comparan las características clínicas, epidemiológicas, resultados de laboratorio, test diagnósticos, tratamiento inicial y su respuesta de estas dos formas de presentación.

### **1.2. Leishmaniasis ganglionar (LLL). Descripción**

Se desarrollan las peculiaridades de esta forma de presentación típica de inmunocompetentes

## **Objetivo 3: Marcadores de cura en leishmaniasis**

Se reclutó una muestra de pacientes enfermos y curados con diferentes formas clínicas de leishmaniasis para realizar diferentes test parasitológicos e inmunológicos que pudieran servir como marcadores de cura tras tratamiento.

Este objetivo ha sido compartido con la tesis de la doctoranda Belén Matía Hernando (que versa sobre el impacto del brote en la población inmunosuprimida no VIH), por lo que en este trabajo solo se presentan los resultados que afectan a los pacientes con LLL.

# MATERIAL y MÉTODOS



## **Diseño**

Estudio observacional longitudinal de una cohorte prospectiva de pacientes, con recogida retrospectiva de datos.

La cohorte de pacientes incluye todos los pacientes con leishmaniasis visceral adultos (mayores de 14 años) atendidos en el servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Fuenlabrada (HUF) durante el brote epidémico (51), desde junio de 2009 hasta junio de 2018.

Con los datos recogidos se realizó un análisis descriptivo de las características clínicas, métodos diagnósticos y tratamiento de la cohorte. En esta tesis detallamos los resultados de los pacientes inmunocompetentes. Debemos reseñar que la recogida de datos ha sido común con otras dos tesis: la tesis “Estudio del impacto del brote de leishmaniasis en la cohorte de pacientes VIH del Hospital Universitario de Fuenlabrada en la población VIH” (Dra. Alicia Castro), leída el martes 20 de diciembre de 2016, obteniendo la calificación “cum laude” en la URJC (55), centrada en los pacientes VIH; y la tesis “Impacto de un brote de leishmaniasis en población inmunosuprimida no VIH” (Dra. Belén Matía), recientemente defendida a la finalización de esta obra, y centrada en los pacientes en terapias biológicas, por lo que algunos aspectos del material y métodos y los resultados comparativos entre grupos pueden ser compartidos.

## **Biomarcadores**

Estudio observacional de casos-control para comparar la respuesta de dos biomarcadores de exposición a *Leishmania infantum* en las diferentes formas clínicas

de leishmaniasis (cutánea, visceral, mucosa y ganglionar) en pacientes enfermos y curados. Los biomarcadores son el índice de estimulación tras linfoproliferación frente a la estimulación con antígeno soluble de *Leishmania* (SLA-CPA) y los niveles de IFN-gamma tras linfoproliferación frente a la estimulación con antígeno soluble de *Leishmania*. Este estudio se presenta en esta tesis para caracterizar la respuesta inmunológica a LLL.

### **Población de Fuenlabrada**

El Hospital Universitario de Fuenlabrada (HUF) se inauguró en 2004 y es el único hospital público de referencia para el área sanitaria 9 de la Comunidad de Madrid. Atiende a una población de 221.986 habitantes, repartidos entre las localidades de Fuenlabrada, Humanes de Madrid y Moraleja de Enmedio (56). Es un hospital comunitario de 400 camas, y ligado a la Universidad Rey Juan Carlos. Dispone de una amplia cartera de servicios, con la excepción de algunas especialidades quirúrgicas complejas como Neurocirugía, Cirugía Cardíaca o Cirugía Plástica.

El hospital está situado en la localidad de Fuenlabrada, al suroeste de Madrid. En los últimos años la ciudad de Fuenlabrada ha presentado un significativo aumento de población, desde los 18.442 habitantes de 1975, hasta alcanzar los 200.000 a día de hoy (57). Es una población joven (40% menores de 20 años), y cuenta con 29.758 inmigrantes censados (13% de la población), que proceden mayoritariamente de Rumanía (20.3%), Marruecos (15.75%), Nigeria (8.45%), China (6.35%), Colombia (5.68%), Ecuador (5.68%) y Guinea Ecuatorial (4.43%) (57).

## **Muestra**

Para el análisis descriptivo se incluyeron todos los pacientes de la cohorte: leishmaniasis visceral adultos atendidos en el servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Fuenlabrada durante el brote desde junio de 2009 hasta junio de 2018.

Se excluyeron, por tanto, los pacientes pediátricos (menores de 14 años) y también los pacientes receptores de órgano sólido residentes en Fuenlabrada, cuyo centro de referencia es el Hospital Doce de Octubre de Madrid. A fecha 1 de Octubre de 2018 tenemos constancia de 38 casos pediátricos y 8 en pacientes trasplantados (datos del servicio de Medicina Preventiva del HUF).

## **Biomarcadores**

Del total de la cohorte se reclutaron 141 casos de pacientes diagnosticados de leishmaniasis para extracción de muestras para estudio de biomarcadores. La recogida de muestras se realizó entre enero de 2013 y junio de 2015. Se incluyeron todos los pacientes diagnosticados en este período, recogidos de forma consecutiva y que consintieron en participar en el estudio, bien en el momento del diagnóstico de diferentes formas de leishmaniasis activa, bien a los 3 meses del fin de tratamiento para las muestras representativas de pacientes curados. Los pacientes firmaron un consentimiento informado revisado por el Comité de Ética del HUF que aprobó el diseño del estudio (Apéndices 1 y 2).

Se obtuvieron muestras de un total de 68 pacientes con leishmaniasis activa (enfermos): 33 con leishmaniasis visceral (LV), 27 con leishmaniasis cutánea (LC), 6 con

leishmaniasis ganglionar (LLL) y 2 con leishmaniasis mucosa (LM); y de 126 pacientes tras tratamiento (curados); 61 con LV, 41 con LC, 21 con LLL y 3 con LM.

Se presentan en esta tesis los resultados relativos a LLL por su interés pronóstico.

## **Definiciones**

Caso de leishmaniasis visceral (LV)(3): Al menos uno de estos:

- Paciente con clínica compatible (fundamentalmente fiebre prolongada e intermitente, pérdida de peso y esplenomegalia) con confirmación serológica y/o parasitológica.
- Paciente VIH en el que se detecta *Leishmania spp* en la histología o en el cultivo de una muestra de hígado, médula ósea, ganglio linfático o bazo.

Caso de leishmaniasis localizada linfadenopática o leishmaniasis ganglionar (LLL)(41):

- Paciente con adenopatías (ganglios > 1 cm en región laterocervical o axilar; o > 2 cm en región inguinal) como única manifestación clínica en el momento del diagnóstico, con confirmación parasitológica en la citología de la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) del ganglio linfático.

Respuesta al tratamiento(3):

- Respuesta inicial: Mejoría clínica al final del tratamiento.
- Respuesta definitiva (paciente curado): Ausencia de clínica 6 meses tras finalizar el tratamiento.

Síndrome hemofagocítico ó Linfohistiocitosis Hemofagocítica (HLH): Los criterios diagnósticos fueron re-definidos en 2004 por el Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Study Group (47) y se reflejan en la Tabla 2.

- 
1. Familial disease/known genetic defect or
  2. Clinical and laboratory criteria (5/8 criteria should be fulfilled)
    - Fever
    - Splenomegaly
    - Cytopenia  $\geq 2$  cell lines
      - Hemoglobin  $< 90$  g/L (below 4 weeks of age,  $< 100$  g/L)
      - Platelets  $< 100 \times 10^9/L$
      - Neutrophils  $< 1 \times 10^9/L$
    - Hypertriglyceridemia and/or hypofibrinogenemia
      - Fasting triglycerides  $\geq 3$  mmol/L
      - Fibrinogen  $< 1.5$  g/L
    - Ferritin  $\geq 500 \mu\text{g/L}^*$
    - sCD 25  $\geq 2400$  U/mL
    - Decreased or absent NK cell activity
    - Hemophagocytosis in BM, CSF, or lymph nodes
- 

Supportive evidence is cerebral symptoms with moderate pleocytosis and/or elevated protein, elevated transaminases, bilirubin, and lactate dehydrogenase. sCD indicates soluble interleukin-2 receptor.

\*A higher cutoff of  $3000 \mu\text{g/L}$  has been suggested as being more specific.<sup>21</sup>

Tabla 2. Criterios diagn3sticos del S3ndrome Hemofagoc3tico o HLH (47)

## Variables

### Datos epidemiol3gicos:

Edad, g3nero, pa3s de origen, raza, tiempo transcurrido desde el comienzo de los s3ntomas hasta el diagn3stico, estatus inmunol3gico (todo paciente con VIH, c3ncer, cirrosis hep3tica, en tratamiento con esteroides o inmunosupresores se consider3 paciente inmunodeprimido).

### Variables cl3nicas:

Fiebre, otros s3ntomas al diagn3stico, esplenomegalia al examen f3sico o por ultrasonograf3a/TAC ( $> 13$  cm de di3metro cefalocaudal), adenopat3as ( $> 1$  cm en regi3n laterocervical o axilar; o  $> 2$  cm en regi3n inguinal) y su localizaci3n, anemia (hemoglobina  $< 12$  mg/dl), leucopenia ( $< 4.000$  leucocitos/ $\text{mm}^3$ ), trombocitopenia ( $<$

150.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>), reactantes de fase aguda (proteína C reactiva -PCR-, velocidad de sedimentación globular -VSG-, ferritina) e hipergammaglobulinemia,.

#### Variables de diagnóstico:

Realización o no de la prueba y resultado en su caso de: aspirado de médula ósea, serología, cultivo *NNN* y reacción en cadena de polimerasa (PCR) para determinación de DNA de *Leishmania*. En cuanto a la serología consistió en test rápido inmunocromatográfico basado en el antígeno rK39 (rK39-ICT), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y/o test de ELISA.

#### Variables de tratamiento y evolución:

Tipo de fármaco empleado, dosis, efectos adversos, respuesta inicial y respuesta definitiva.

### **Test realizados para diagnóstico de leishmaniasis durante el brote**

#### Aspirado de médula ósea:

La médula es extraída por especialistas de Hematología Clínica y el aspirado revisado el mismo día de su extracción por un hematólogo especializado del servicio de Análisis Clínicos, que realiza un recuento diferencial de 200 a 400 células nucleadas de médula ósea teñidas con tinción de Wright.

#### Serología test rápido inmunocromatográfico (rK39-ICT):

Se trata de unos dipsticks colorimétricos que detectan anticuerpos frente al antígeno rK39, específico de *Leishmania* (SD Leishmania Ab; Standard Diagnostics, INC., Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea), y fueron realizados según las instrucciones del fabricante. Los resultados están disponibles en menos de una hora. Se introdujo en

nuestro laboratorio a raíz de la detección del brote y está disponible en nuestro hospital desde abril de 2011.

#### Serología ELISA

Se detectan con el método ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) anticuerpos totales frente a *Leishmania* (leishmania ELISA IgG + IgM; Vircell Microbiologists, Granada, España). Esta técnica también se considera equivalente al IFI, se adquirió en nuestro centro a raíz de la detección del brote y está disponible en nuestro hospital desde abril de 2011.

#### Serología Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Se considera la serología gold-standard clásica para leishmaniasis. Antes de abril de 2001 las muestras para serología de *Leishmania* se derivaron al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Severo Ochoa de Leganés para realización de IFI. Se consideraron positivos títulos de 1:80 (Leishmania Indirect Immunofluorescence Antibody Test; Vircell Microbiologists, Granada, España).

#### Cultivo de *Leishmania*:

Las muestras para cultivo (médula ósea) se derivan de forma sistemática al Centro Nacional de Microbiología del ISCIII (Majadahonda, Madrid). Se siguió la técnica habitual inoculando las muestras de médula ósea en un medio Novy-McNeal-Nicolle (NNN). Todos los cultivos se incubaron a temperatura ambiente (22°C to 25°C) y se examinaron cada semana durante 6 semanas.

### Determinación de DNA de *Leishmania* por PCR (polimerase chain reaction):

Las muestras para PCR (sangre y médula ósea) se derivan de forma sistemática al Centro Nacional de Microbiología del ISCIII (Majadahonda, Madrid). El método fue el mismo empleado para la determinación de biomarcadores que se describe en profundidad más adelante.

### **Test realizados para estudio de biomarcadores**

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizaron los siguientes test para comparar los resultados antes y después de tratamiento:

- Serología test rápido inmunocromatográfico (rK39-ICT)
- Serología IFI
- Determinación de DNA de *Leishmania* por PCR
- Índice de estimulación tras linfoproliferación frente a la estimulación con antígeno soluble de *Leishmania* (SLA-CPA)
- IFN-gamma tras linfoproliferación frente a la estimulación con antígeno soluble de *Leishmania*.

Los test para este estudio fueron realizados en su totalidad en la Unidad de Leishmaniasis y Chagas del Centro Nacional de Microbiología del ISCIII (Majadahonda, Madrid), dirigido por el Dr. Javier Moreno y se utilizaron únicamente para el diseño de este estudio, sin fines diagnósticos. Se describen a continuación los test realizados:

### Serología test rápido inmunocromatográfico (rK39-ICT):

Se utilizó el dipstick Kalazar Detect Rapid Test 129 (InBIOS International, Seattle, WA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Determinación de DNA de *Leishmania* por PCR (polimerase chain reaction):

Se obtuvo el DNA genómico a partir de 100 µL de sangre periférica usando el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo un eluido en un volumen final de 200 µL de PCR-grade water. Los extractos se almacenan a 4 °C (máximo 3 días). Para detectar DNA de *Leishmania* se usó una nested PCR (LnPCR), siendo la diana una subunidad del ribosoma (Small Subunit Ribosomal ribonucleic acid gene, SSU-rRNA (18S RNA)). Se amplifica en un primer paso usando cebadores R221 and R332 (58); la PCR resultante se testó con una posterior amplificación con cebadores R233 and R333, siguiendo el método Cruz *et al* (59).

#### Serología Inmunofluorescencia indirecta (IFI):

Los análisis se realizaron con las muestras de plasma utilizándose una suspensión de  $2 \times 10^5$  promastigotes de *L. infantum* (MHOM/FR/1978/LEM-75) fijados en un portaobjetos mediante acetona. En cada portaobjetos se incluyó un control negativo y positivo. Tras una incubación de 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C, se realizaron tres lavados con PBS a temperatura ambiente mediante agitación ligera y posteriormente se procedió a realizar diluciones desde 1/20 hasta 1/640 para determinar los niveles totales de IgG. Los niveles de IgG se determinaron añadiendo IgG antihumana de cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Fluoline G) (Bio-Mérieux, France) diluido a 1/200, estimándose la prueba como positiva cuando la muestra presentó un título de anticuerpos superior a 1/80.

### Test de proliferación celular frente a antígeno soluble de *Leishmania* (SLA-cell proliferation assay; SLA-CPA)

Primero debe prepararse el antígeno soluble de *L. infantum*, que se obtiene de una fase estacionaria de cultivos de promastigotes (JPC strain, MCAN/ES/98/LLM-722) según la técnica descrita por el grupo del Dr Moreno (27). Por otro lado, se aíslan los linfocitos (PBMC) del paciente centrifugando con la técnica Ficoll-Hypaque (Rafer, Spain). Las células aisladas se cultivan en RPMI 1640 suplementado con 10% suero bovino fetal heat-inactivated, 100 IU/ml penicilina, 100µg/ml estreptomina, 2mM L-glutamina, 50µM 2-mercaptoetanol, y 1mM piruvato sódico. Se inoculan en 96 pocillos y se conservan con RPMI 1640 sólo (controles) o se les añade el antígeno soluble de *Leishmania* (SLA) (10µg/ml). Se conservan todos ellos en una atmósfera 5% CO<sub>2</sub> humidificada a 37°C durante 5 días. Se mide la proliferación celular con el kit Cell Proliferation Biotrak ELISA Kit (General Electric Healthcare Life Sciences, UK). Los resultados se muestran como un índice de estimulación (SI) que resulta de dividir la proliferación de los linfocitos estimulados con SLA (SLA-CPA) frente al control.

### Cuantificación citométrica de interferón gamma (IFN-γ)

Se midió la producción de IFN-γ en 50 µl del sobrenadante obtenido de los cultivos de proliferación referidos previamente, estimulados con SLA (SLA-CPA) o los controles de linfocitos no estimulados (control PBMC), usando el set comercial BD Cytometric Bead Array Human Flex Set (Beckton Dickinson Biosciences, New Jersey, USA). Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -20°C para el análisis posterior de citoquinas. Se recogieron los datos usando un citómetro de flujo FACSCalibur y analizados con Flow Cytometric Analysis Program Array (Beckton

Dickinson Biosciences, New Jersey, USA). Los niveles de IFN- $\gamma$  se presentaron como la diferencia de concentración, en pg/mL, entre los SLA-CPA y los controles.

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa de Windows SPSS 20.0. Las variables cualitativas se caracterizaron mediante la distribución de sus frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas se han ofrecido a través de su media o mediana  $\pm$  desviación estándar (DE), rango o intervalo de confianza del 95%.

Se compararon las variables categóricas en términos de forma visceral (LV) frente a ganglionar (LLL), de inmunocompetentes (IC) frente a inmunodeprimidos (ID) y de pacientes antes y después del brote. Para ello se utilizó para las variables categóricas el test Chi cuadrado o el test de Fisher si el número de episodios esperados en algún apartado era menor de 5, el test t de Student para las variables cuantitativas paramétricas y el Mann–Whitney U-test para las variables cuantitativas no paramétricas.

Se llevó a cabo un análisis multivariante mediante regresión logística para determinar la asociación con fracaso o recidiva tras tratamiento de la LV en los pacientes inmunocompetentes, controlando a su vez el efecto de posibles factores de confusión.

Se fijó un valor de  $P < 0.05$  como nivel de significación estadística.

### **Biomarcadores:**

Se definieron los cut-offs para la linfoproliferación (CPA) en función del área bajo la curva ROC, con intervalos de confianza al 95%. Los valores para las variables

antes y después de tratamiento se compararon con el Mann–Whitney U-test, considerando significativa una  $p < 0.05$ .

## Financiación

Este trabajo ha recibido apoyo económico de la —Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales|| (RICET + RD12/0018/0008), VI PN de I + D + I 2008–2011, ISCIII— Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa; y fondos FEDER.



# RESULTADOS



## OBJETIVO 1: DESCRIPCIÓN CLÍNICA DEL BROTE

### **1.1. DESCRIPCIÓN GLOBAL**

#### **1.1.1. Formas clínicas y distribución por años**

Desde el inicio oficial del brote epidémico en 2009 hemos atendido a 141 pacientes adultos con leishmaniasis no cutánea. La mayoría de ellos se presentaron como una leishmaniasis visceral típica (LV) (110 pacientes, 78%). Únicamente 3 pacientes (2.1%) presentaron una leishmaniasis mucosa (LM), y el resto (28 pacientes, 19.9%) se presentaron clínicamente como una leishmaniasis ganglionar (LLL).

En la Figura 5 se muestra la distribución de pacientes atendidos y diagnosticados por año desde el inicio del brote (contando cada año desde el 1 de junio hasta el 31 de mayo del año siguiente).

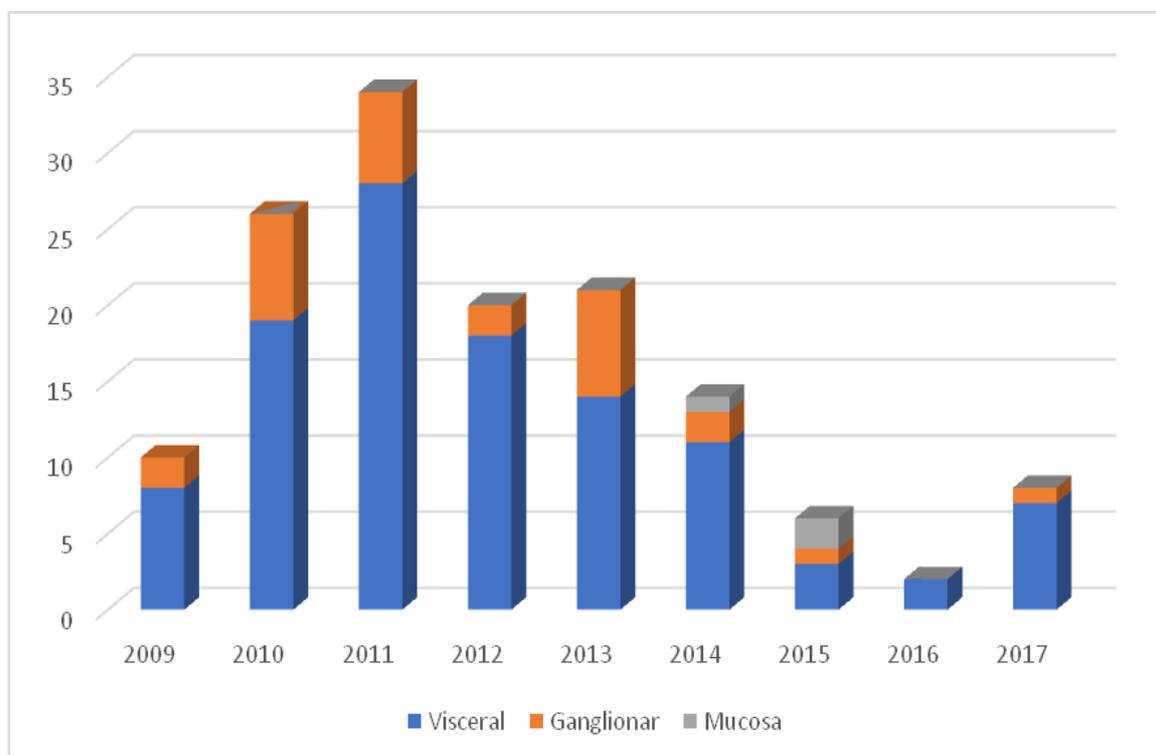


Fig. 5. Pacientes con leishmaniasis no cutánea atendidos en el Hospital Universitario de Fuenlabrada desde el inicio del brote epidémico.

### 1.1.2. Características epidemiológicas

El 68.1% (96 pacientes) fueron hombres, con una media de 45,6 años (desviación típica 15.858, rango 15-95). La Figura 6 refleja la distribución de edades de los pacientes.

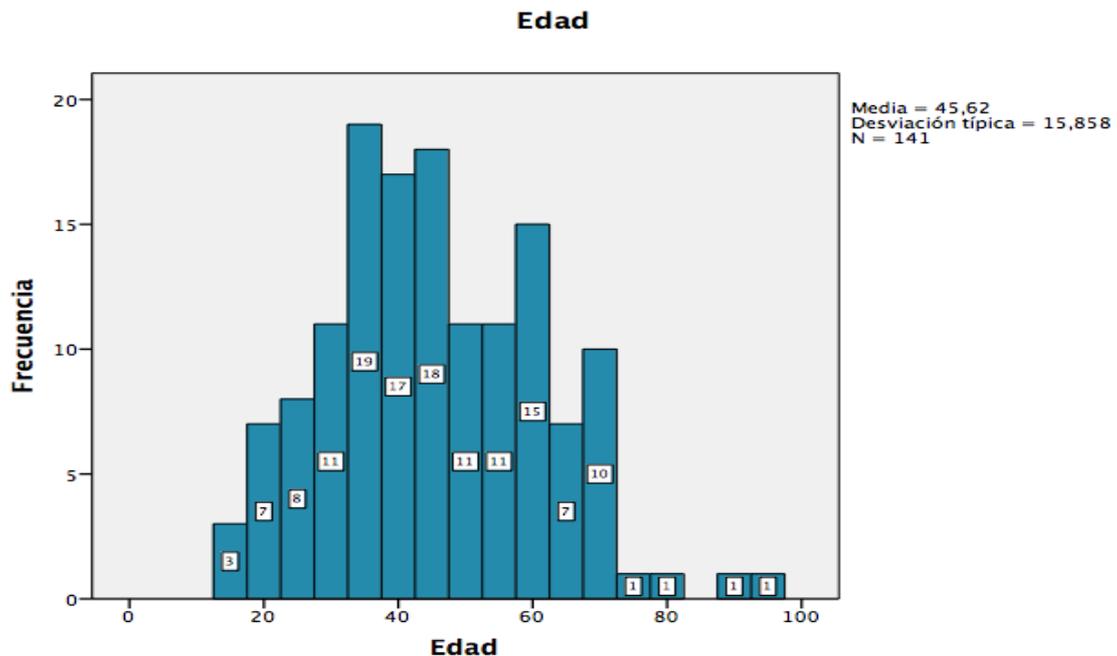


Fig. 6. Distribución de los pacientes atendidos con leishmaniasis en función de su edad.

La mayoría de los pacientes atendidos (77, 54.6%) son de nacionalidad española. Los 64 pacientes no nacidos en España se reparten entre 48 pacientes originarios del África subsahariana (34%), 6 pacientes de Europa del Este (4.3%), 6 de Sudamérica y Centroamérica (4.3%) y 4 pacientes de origen asiático. La distribución de países de origen podemos observarla en la Figura 7, donde podemos ver que la mayoría de los pacientes son de Guinea Ecuatorial y Nigeria. Todos los pacientes inmigrantes llevaban residiendo más de 6 meses en España.

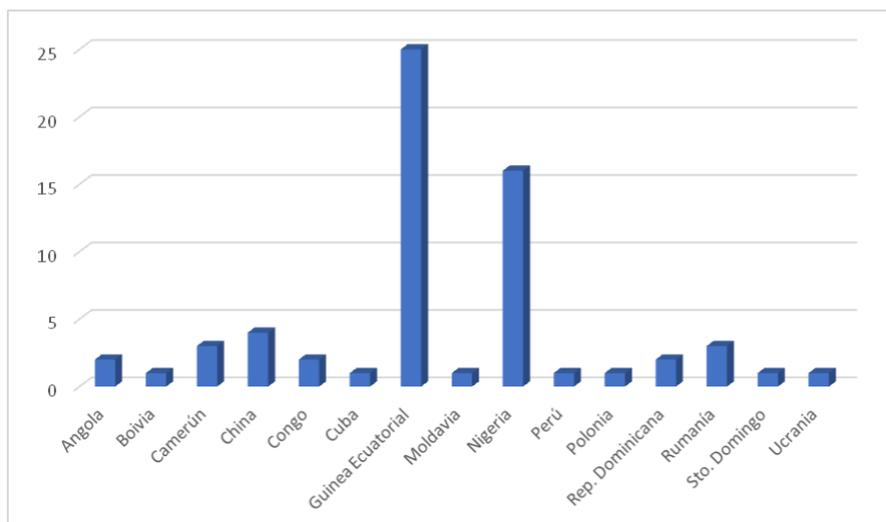


Fig. 7. Pacientes extranjeros atendidos según su país de origen.

### 1.1.3. Status inmunológico

De los 141 pacientes atendidos desde el inicio del brote epidémico, la mayoría (103, 73%) fueron inmunocompetentes. Hubo 38 pacientes (27%) inmunodeprimidos, de los que 11 pacientes (7.8%) eran VIH, 19 pacientes (13.5%) se encontraban en tratamiento con algún tipo de inmunosupresor de la inmunidad celular (esteroides, metotrexate o fármacos biológicos), 5 pacientes (3.5%) presentaban una cirrosis hepática y 3 pacientes (2.1%) tenían algún tipo de neoplasia maligna activa.

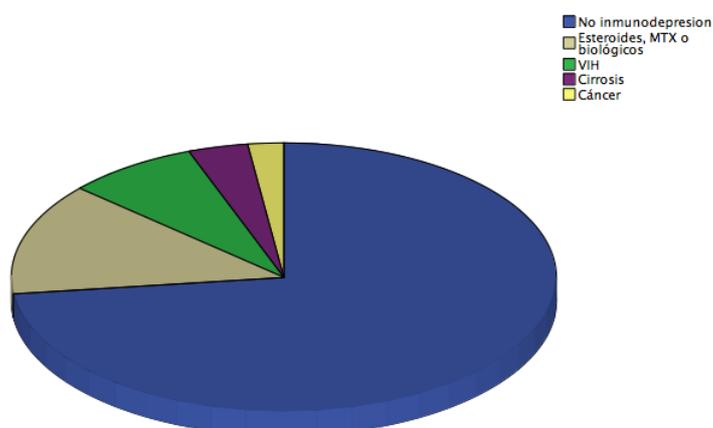


Fig. 8. Distribución de los pacientes según su estatus inmunológico y tipo de inmunodepresión.

Las principales características epidemiológicas y clínicas de todos los pacientes, en función de su estatus inmunológico, aparecen reflejadas en la Tabla 3:

Tabla 3. Características clínicas de todos los pacientes atendidos en función de su estatus inmunológico.

	IC (103)	ID (38)	TOTAL (141)	P
Varones (n,%)	68 (66%)	28 (73.7%)	96 (68.1%)	0.386
Edad (media)	43.57	51.18	45.62	<b>0.011</b>
Inmigrantes (n,%)	54 (52.4%)	10 (26.3%)	64 (45.4%)	<b>0.006</b>
África subsahariana (n,%)	43 (41.7%)	5 (13.2%)	48 (34%)	<b>0.010</b>
Etnia negra (n,%)	47 (45.6%)	6 (15.8%)	53 (37.6%)	<b>0.001</b>
Fiebre (n,%)	73 (70.9%)	32 (84.2%)	105 (74.5%)	0.107
Cefalea (n,%)	28/77 (36.4%)	5 (13.2%)	33/115 (28.7%)	<b>0.010</b>
Esplenomegalia clínica	21/102 (20.6%)	14 (36.8%)	35/140 (25%)	<b>0.048</b>
Esplenomegalia radiológica	67/83 (80.7%)	31/37 (83.8%)	98/120 (81.7%)	0.689
Anemia (Hb<12 mg/dl) (n,%)	66/102 (64.7%)	32 (84.2%)	98/140 (70%)	<b>0.025</b>
Leucopenia (<4000/mm <sup>3</sup> ) (n,%)	68/102 (66.7%)	32 (84.2%)	100/140 (71.4%)	<b>0.041</b>
Trombopenia (<150000/mm <sup>3</sup> ) (n,%)	70/102 (68.6%)	34 (89.5%)	104/140 (74.3%)	<b>0.012</b>
PCR > 2 mg/dl	70/97 (72.2%)	29/37 (77.8%)	99/134 (73.9%)	0.464
Ferritina > 300 ng/mL	68/84 (81%)	24/26 (92.3%)	92/110 (83.6%)	0.232
VSG > 30 mm/h	38/54 (70.4%)	18/20 (90%)	56/74 (75.7%)	0.126

IC: inmunocompetentes, ID: inmunodeprimidos

Las diferencias significativas fueron: una edad media mayor en el grupo de inmunodeprimidos, una mayor proporción de pacientes de origen y/o etnia subsahariana y presentación con cefalea entre los inmunocompetentes, y una mayor

proporción de pacientes con pancitopenia y esplenomegalia a la exploración (aunque radiológicamente no llegó a ser significativa) entre los inmunodeprimidos.

Sin embargo, se encontraron importantes diferencias en cuanto a las formas de presentación. Los 3 pacientes con leishmaniasis mucosa eran inmunodeprimidos, mientras que los 28 pacientes que presentaron una leishmaniasis ganglionar, eran todos inmunocompetentes (27.2% del total de IC). Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

Por tanto, para describir las características clínicas de los pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis debemos analizar de forma independiente cada forma de presentación. Nos centraremos primero en la leishmaniasis visceral típica y posteriormente en la leishmaniasis ganglionar, y dejaremos de lado la leishmaniasis mucosa ya que los tres casos ocurrieron en inmunodeprimidos.

## 1.2. LEISHMANIASIS VISCERAL TÍPICA (LV). COMPARACIÓN CON LV EN INMUNODEPRIMIDOS.

### 1.2.1. Características clínicas y epidemiológicas

Durante el brote han sido atendidos en total 110 pacientes adultos con LV, de los cuales 75 eran inmunocompetentes (68.2%) y 35 inmunodeprimidos (31.8%). La comparación de las características clínicas y epidemiológicas se refleja en la Tabla 4:

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con LV (excluidos LLL y LM) en función de su estatus inmunológico.

	IC (75)	ID (35)	TOTAL (110)	P
Varones (n,%)	53 (70.7%)	26 (74.3%)	79 (71.8%)	0.694
Edad (media)	43.07	49.91	45.25	<b>0.038</b>
Inmigrantes (n,%)	48 (64%)	10 (28.6%)	58 (52.7%)	<b>0.001</b>
África subsahariana (n,%)	40 (53.3%)	5 (14.3%)	45 (40.9%)	<b>&lt; 0.001</b>
Raza negra (n,%)	44 (58.7%)	6 (17.1%)	50 (45.5%)	<b>&lt; 0.001</b>
Fiebre (n,%)	73 (97.3%)	31 (88.6%)	104 (94.5%)	0.080
Cefalea (n,%)	28/74 (37.8%)	5 (14.3%)	33/109 (30.3%)	<b>0.012</b>
Esplenomegalia clínica	20/74 (27%)	14/35 (40%)	34/109 (31.2%)	0.172
Esplenomegalia radiológica	66/70 (94.3%)	31/34 (91.2%)	97/104 (93.3%)	0.680
Anemia (Hb<12 mg/dl) (n,%)	64/74 (86.5%)	31 (88.6%)	95/109 (87.2%)	0.761
Leucopenia (<4000/mm <sup>3</sup> ) (n,%)	66/74 (89.2%)	32 (91.4%)	98/109 (89.9%)	0.717
Trombopenia (<150000/mm <sup>3</sup> ) (n,%)	69/74 (93.2%)	34 (97.1%)	103/109 (94.5%)	0.662
PCR > 2 mg/dl	69/72 (95.8%)	28/34 (82.4%)	97/106 (91.5%)	<b>0.020</b>
Ferritina > 300 ng/mL	65/68 (95.6%)	24/25 (96%)	89/93 (95.7%)	1.000
VSG > 30 mm/h	36/42 (85.7%)	18/19 (94.7%)	54/61 (88.5%)	0.418
VSG > 60 mm/h	28/42 (66.7%)	10/19 (52.6%)	38/61 (62.3%)	0.295

IC: inmunocompetentes, ID: inmunodeprimidos

Al excluir las formas ganglionares y mucosas, comprobamos que las diferencias entre inmunocompetentes e inmunodeprimidos varían en algunos aspectos. Seguimos encontrando una edad media mayor en el grupo de inmunodeprimidos; y una mayor proporción de pacientes de origen sub-sahariano (aunque de forma si cabe más evidente que antes) y presentación con cefalea entre los inmunocompetentes. Sin embargo, desaparecen las diferencias respecto a la pancitopenia y la esplenomegalia, pero aparece una cifra de PCR mayor en los inmunocompetentes.

También observamos un predominio de la ausencia de fiebre entre los pacientes inmunodeprimidos. Así, solo 2 pacientes inmunocompetentes se presentaron sin fiebre: una mujer de 64 años de raza negra y originaria de Guinea Ecuatorial que consultó por disnea y dolor abdominal y presentaba pancitopenia en el estudio, y un hombre de 42 años de raza blanca y nacido en España, asintomático, que fue diagnosticado durante un estudio por trombopenia y leucopenia. Por otro lado, de los 4 pacientes inmunodeprimidos que se presentaron sin fiebre, 3 eran VIH y uno se encontraba en tratamiento inmunosupresor.

Los pacientes han referido una gran variedad de síntomas, resumidos en el siguiente gráfico (Figura 9), sin observarse diferencias significativas entre pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos salvo los ya reflejados en la tabla 4:

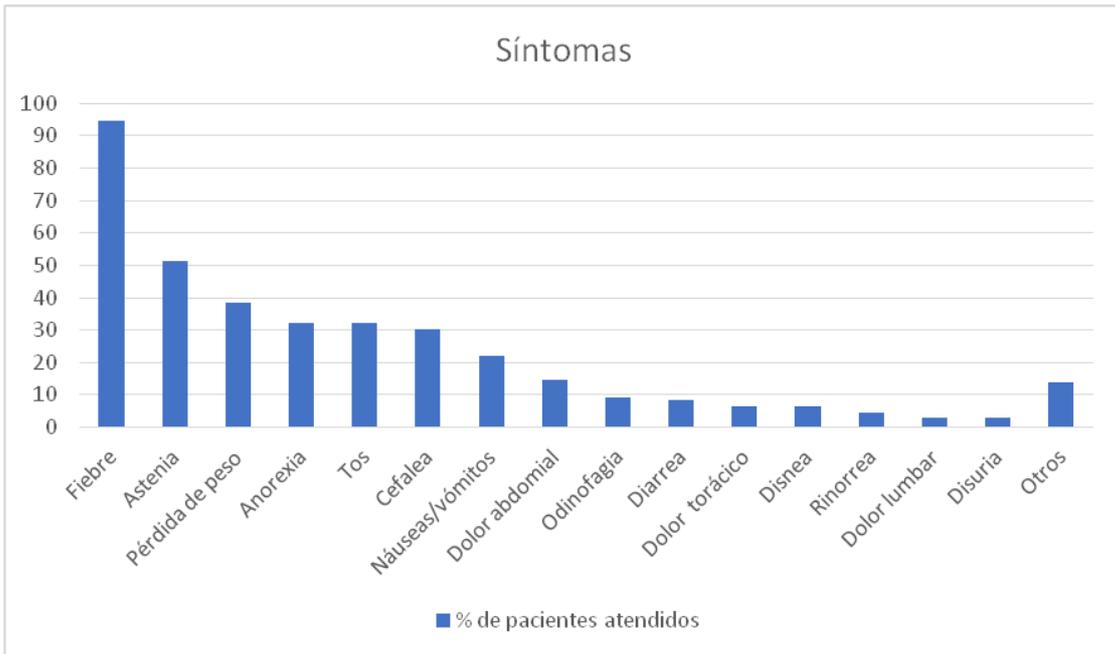


Fig. 9. Síntomas referidos por los pacientes con LV, y porcentaje de pacientes que los presentaron.

Finalmente, para evaluar la presencia de desnutrición como factor de riesgo de leishmaniasis, se recogió el peso de los pacientes antes del inicio del tratamiento. En toda la muestra el peso medio fue 77.2 kg, mediana 75, des. típica 18.9, rango 38-131. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del estatus inmunológico (media de 78.8Kg en inmunocompetentes vs 73.6 Kg en inmunodeprimidos,  $p=0.19$ ). Tampoco hubo diferencias entre los pacientes de origen sub-sahariano (79.5 kg) vs resto (75.4kg),  $p=0.25$ .

### **1.2.2. Leishmaniasis visceral y adenopatías**

Como veremos más adelante, la forma de presentación de la leishmaniasis ganglionar consiste en la presencia de adenopatías en ausencia de otros datos clínicos típicos de leishmaniasis visceral. Sin embargo, hemos encontrado 3 pacientes con LV típica en los que se han objetivado adenopatías durante la evolución de su enfermedad:

Un varón de 36 años de origen nigeriano se presentó con fiebre, anemia y trombopenia, y en el estudio se objetivaron adenopatías submandibulares, inguinales, axilares y retroperitoneales. El estudio anatomopatológico del ganglio fue compatible con VIH sin objetivarse *leishmania*. Aparentemente el diagnóstico de leishmaniasis visceral coincidió con una probable primoinfección por VIH.

Un varón de 47 años de origen español, VIH positivo, que consultó por astenia, tos y expectoración (pero sin fiebre) presentaba adenopatías laterocervicales, axilares e inguinales bilaterales, además de pancitopenia y esplenomegalia. No se llegó a realizar PAAF de ninguna adenopatía.

Una mujer de 44 años de origen español que se encontraba en tratamiento inmunosupresor, se presentó con fiebre y cuadro constitucional, con pancitopenia, además de una adenopatía submandibular izquierda (sin objetivarse otras en el TC body que se le realizó, que sí objetivó esplenomegalia). La PAAF de la adenopatía se informó como linfadenitis reactiva.

Entre los pacientes inmunocompetentes con LV típica no se observaron adenopatías en ningún caso.

### 1.2.3. Leishmaniasis visceral y síndrome hemofagocítico

Pudimos evaluar 6 de los 8 criterios descritos de síndrome hemofagocítico, o su denominación actual como linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), al no disponer de las técnicas de determinación de la ausencia de actividad NK ni el CD25 soluble.

Se presentan en la Tabla 5 la proporción de pacientes que cumplen el resto de criterios.

Tabla 5. Presencia de criterios HLH\* entre los pacientes con LV, en función de su estatus inmunológico.

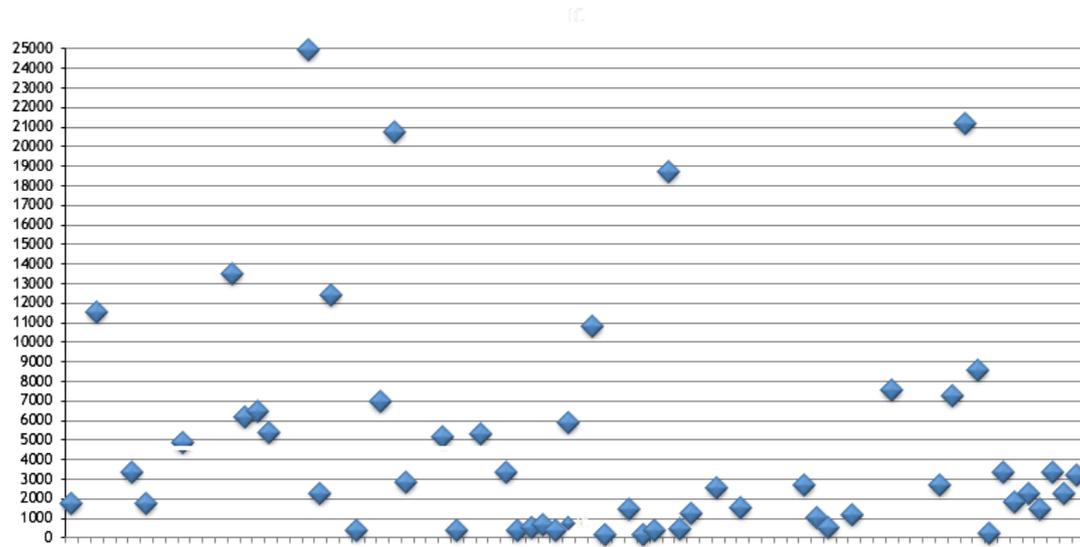
	IC (75)	ID (35)	TOTAL (110)	P
Fiebre (n,%)	73 (97.3%)	31 (88.6%)	104 (94.5%)	0.080
Esplenomegalia	66/70 (94.3%)	31/34 (91.2%)	97/104 (93.3%)	0.680
Citopenias (al menos 2 líneas)	69/74 (93.2%)	33 (94.3%)	102/109 (93.6%)	1.000
Hipertrigliceridemia(>265 mg/dl)	16/71 (22.5%)	7 (20%)	23/106 (21.7%)	0.766
Hemofagocitosis en médula ósea	35/68 (51.5%)	17/33 (51.5%)	52/101 (51.5%)	0.997
Ferritina > 500 µg/L	61/71 (85.9%)	28/32 (87.5%)	89/103 (86.4%)	0.828

IC: inmunocompetentes, ID: inmunodeprimidos

\*No se incluyen la determinación de CD25 soluble, ni la ausencia o disminución de la actividad NK.

Se puede destacar la alta proporción de pacientes que cumplen alguno de los criterios: más del 90% fiebre, esplenomegalia y al menos dos citopenias, más del 85% ferritina elevada y algo más del 50% hemofagocitosis en médula ósea.

En particular, las cifras absolutas de ferritina fueron muy elevadas, sobre todo en los pacientes inmunocompetentes, como puede comprobarse en las Figuras 10 y 11. Aunque las diferencias tampoco llegaron a ser estadísticamente significativas, sí podemos comprobar cómo los valores medios de ferritina fueron superiores a los de los inmunodeprimidos, sobre todo a costa de los pacientes VIH (Figura 11).



Ferritina > 300 97%  
 Ferritina > 1000 76%

Fig. 10. Valores de ferritina (µg/L) de todos los pacientes inmunocompetentes con LV.

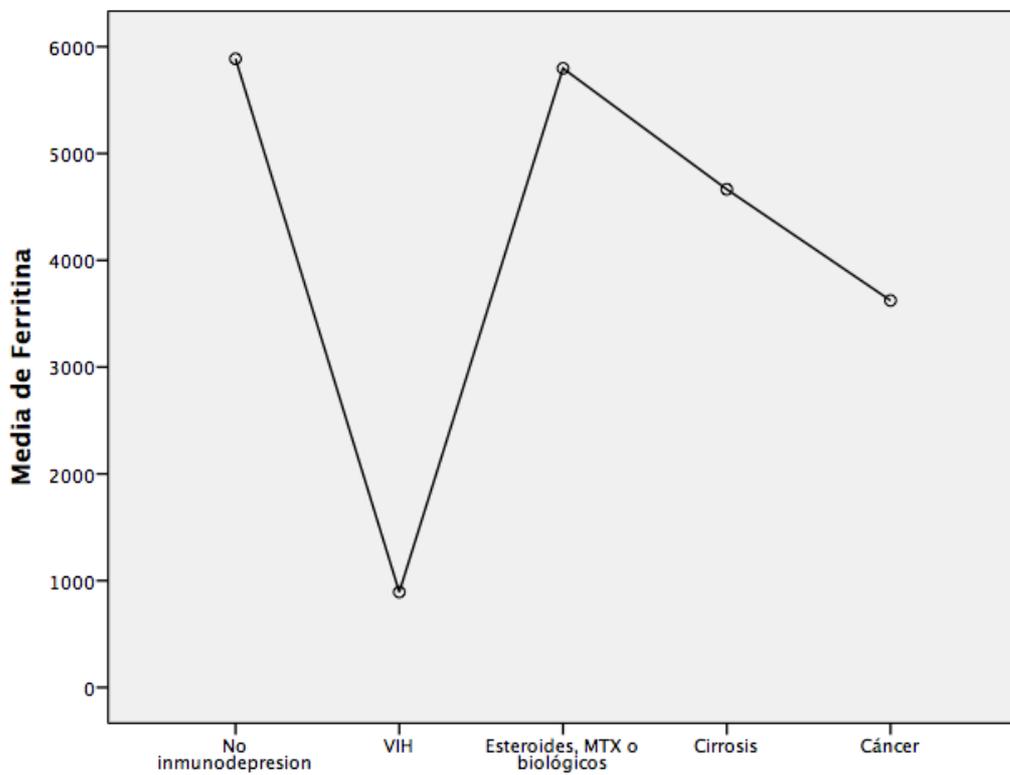


Fig.11. Valores medios de ferritina (µg/L) según estatus inmunológico y tipo de inmunodepresión.

En la Tabla 6 se presenta la proporción de pacientes en función del número de criterios de síndrome hemofagocítico que cumplen:

Tabla 6. Pacientes con LV según el número de criterios de HLH\* que cumplen, en función de su estatus inmunológico.

	<b>IC (75)</b>	<b>ID (35)</b>	<b>TOTAL (110)</b>	<b>P</b>
0 criterios (n,%)	0	0	0	NA
1 criterio (n,%)	2 (2.7%)	0	2 (1.8%)	NA
2 criterios (n,%)	4 (5.3%)	2 (5.7%)	6 (5.5%)	NS
3 criterios (n,%)	15 (20.0%)	9 (25.7%)	23 (21.8%)	NS
4 criterios (n,%)	27 (36.0%)	9 (25.0%)	36 (32.7%)	NS
<b>5 o más criterios (HLH) (n,%)</b>	<b>27 (36.0%)</b>	<b>15 (42.8%)</b>	<b>42 (38.2%)</b>	NS

IC: inmunocompetentes, ID: inmunodeprimidos

NA: No aplicable (casillas con 0 casos), NS: no significativa

\*No se incluyen la determinación de CD25 soluble, ni la ausencia o disminución de la actividad NK.

Podemos destacar que la presencia de síndrome hemofagocítico no depende del status inmunológico y que fue del 36% en inmunocompetentes y del 42.8% en inmunodeprimidos.

Como limitaciones debemos señalar que en 13 pacientes (11.8%) no se pudieron recoger datos más que de 5 de los 6 criterios analizados, en 3 pacientes (2.7%) sólo 4 criterios, y en otros dos pacientes 2 o menos (1.8%). Por tanto, en 18 pacientes (16.4%) hay al menos 3 de los 8 criterios totales que no se pudieron constatar al no disponer de datos.

Debido a la alta proporción de pacientes con LV de raza negra, estudiamos la presencia de síndrome hemofagocítico en función de esta variable, los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Pacientes con LV que cumplen los criterios de HLH\*, en función de si son de raza negra o no.

	<b>Raza negra (50)</b>	<b>Otros (60)</b>	<b>TOTAL (110)</b>	<b>P</b>
0 criterios (n,%)	0	0	0	NA
1 criterio (n,%)	1 (2.0%)	1 (1.7%)	2 (1.8%)	NS
2 criterios (n,%)	3 (2.7%)	3 (2.7%)	6 (5.5%)	NS
3 criterios (n,%)	13 (26.0%)	11 (18.3%)	23 (21.8%)	NS
4 criterios (n,%)	19 (38%)	17 (28.3%)	36 (32.7%)	NS
<b>5 o más criterios (HLH) (n,%)</b>	<b>14 (28.0%)</b>	<b>28 (46.7%)</b>	<b>42 (38.2%)</b>	0.131

NA: No aplicable (casillas con 0 casos), NS: no significativa

\*No se incluyen la determinación de CD25 soluble, ni la ausencia o disminución de la actividad NK.

Respecto a cada uno de los criterios, la única diferencia relevante fue que 19 de 44 (43.2%) pacientes de raza negra presentaban hemofagocitosis en médula ósea, frente a 33 de 57 (56.4%) del resto (p=0.103).

#### 1.2.4. Leishmaniasis visceral y autoinmunidad

Por la forma de presentación clínica, en muchos casos se sospechó la presencia de una enfermedad autoinmune y se solicitó estudio inmunológico. Mostramos en la Tabla 8 la proporción de pacientes que presentaron hipergammaglobulinemia y positividad para auto-anticuerpos o serologías diferentes a *Leishmania*.

Tabla 8. Pacientes con LV que presentaron positividad para otros estudios de inmunidad, en función de su estatus inmunológico.

	IC (75)	ID (35)	TOTAL (110)	P
Hipergammaglobulinemia (n*,%)	31/46 (67.4%)	14/18 (77.8%)	45/64 (70.3%)	0.309
ANAs (n*,%)	11/39 (28.2%)	7/23 (30.4%)	18/62 (29.0%)	0.537
Otras serologías infecciosas (n*,%)	22/52 (42.3%)	9/19 (47.4%)	31/71 (43.7%)	0.454

IC: inmunocompetentes, ID: inmunodeprimidos.

\* número de pacientes con resultado positivo/número de pacientes con test realizado.

Debemos destacar que hasta el 30% de los pacientes presentaron ANAs positivos, y un 44% presentaron serologías positivas para otras infecciones: *Borrelia burgdorferi* 11, *Coxiella burnetti* 10, *Parvovirus* 6, *Mycoplasma* 4, *Chlamydomphila* 4, *Rickettsia* 4, RPR 2.

### 1.2.5. Diagnóstico

Los resultados de las pruebas diagnósticas, tanto serológicas como parasitológicas, realizadas a los pacientes con LV típica se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9. Pruebas diagnósticas realizadas a los pacientes con LV en función del estatus inmunológico.

	IC (75)	ID (35)	TOTAL (110)	P
rk39-ICT*	25/57 (43.9%)	13/27 (48.1%)	38/84 (45.2%)	0.712
ELISA/IFI*	69/73 (94.5%)	35 (100%)	104/108 (96.3%)	0.302
Microscopía óptica* (médula ósea)	28/70 (40%)	17/34 (50%)	45/104 (43,3%)	0.334
Cultivo* (médula ósea)	5/25 (20%)	7/12 (58.3%)	12/37 (32.4%)	<b>0.029</b>
PCR* (médula ósea)	59/65 (90.8%)	33/34 (97.1%)	92/99 (92.9%)	0.417
PCR* (sangre)	19/22 (86.4%)	13/15 (86.7%)	32/37 (86.5%)	1.000

IC: inmunocompetentes, ID: inmunodeprimidos.

\* Número pacientes con resultado positivo/número de pacientes con test realizado (%)

No hubo diferencias en función del status inmunológico, salvo en la rentabilidad del cultivo que fue superior en los pacientes inmunodeprimidos.

Respecto a los pacientes inmunocompetentes, la prueba serológica rápida fue positiva en el 44% de los casos, mientras la serología standard llegó al 95%. Solo se visualizaron parásitos de *Leishmania* en médula ósea en el 40%. La prueba gold-standard resultó la PCR, que fue positiva en el 86% de los pacientes en sangre y 91% en médula ósea.

Sobre la rentabilidad de las pruebas serológicas, encontramos 14 pacientes con sospecha clínica inicial de leishmaniasis donde la serología fue positiva sin que se pudiera confirmar posteriormente el diagnóstico, descartándose finalmente la

leishmaniasis (Tabla 10), y siendo considerados falsos positivos de la serología. 4 de ellos eran pacientes con enfermedades autoinmunes de base, y en 2 casos se confirmó el diagnóstico de fiebre Q.

Tabla 10. Falsos positivos de la serología.

Falsos positivos	IC	ID	Total
<b>rk39-ICT*</b>	1/74 (99%)	0/24 (100%)	1/98 (99%)
<b>ELISA/IFI*</b>	11/93(88%)	2/29 (93%)	13/122 (89%)

\*número de pacientes con resultado falso positivo/número de pacientes con resultado verdadero negativo (entre paréntesis especificidad de la prueba)

#### **1.2.6. Tratamiento y recidivas**

De los 110 pacientes con LV atendidos hubo 3 que no recibieron ningún tratamiento: 2 pacientes inmunocompetentes no acudieron a tratarse y se perdieron en el seguimiento, y un paciente falleció por complicaciones de su cirrosis avanzada antes de poder comenzar el tratamiento.

Del total de 107 pacientes que recibieron tratamiento, 103 se trataron con anfotericina B liposomal y 4 con anfotericina B complejo lipídico, a las dosis reflejadas en la Tabla 11:

Tabla 11. Dosis y evolución clínica de los pacientes con LV típica, en función de su status inmunológico y tipo de inmunodepresión.

Dosis de Anfotericina B liposomal	LV (n=107)	Recidivas (n=14, 13.1%)
<b>IC</b>	<b>73</b>	<b>7 (9.6%)</b>
15 mg/kg	2	1 (50%)
18 mg/kg	5	3 (60%)
21 mg/kg	60 ABL + 2 ABCL	3 (4.8%)*
30 mg/kg	3 ABL + 1 ABCL	0
<b>ID</b>	<b>34</b>	<b>7 (20.6%)</b>
<b>VIH</b>	<b>11</b>	<b>3 (27.3%)</b>
21 mg/kg	1	1 (100%)
30 mg/kg	4	2 (50%)
40 mg/kg	6	0
<b>TTO IS</b>	<b>16</b>	<b>3 (18.75%)</b>
21 mg/kg	3 ABL + 1 ABCL	1 (25%)**
30 mg/kg	4	1 (25%***)
40 mg/kg	8	1 (12.5%)
<b>Cirrosis</b>	<b>4</b>	<b>1 (25%)</b>
21 mg/kg	2	0
30 mg/kg	2	1 (50%***)
<b>Neoplasia maligna</b>	<b>3</b>	<b>0 (0%)</b>
21 mg/kg	1	0
30 mg/kg	1	0
40 mg/kg	1	0

IC: Inmunocompetentes. ID: Inmunodeprimidos. ABCL: Anfotericina B complejo lipídico.

\* Uno de los pacientes tratado con ABCL.

\*\* El paciente tratado con ABCL fue el único caso considerado fracaso a fin de tratamiento.

\*\*\* Fallecido durante el retratamiento

Como se observa en la Tabla 11, todos los pacientes salvo uno se consideraron clínicamente curados al final del tratamiento, por lo que la respuesta a final de tratamiento fue del 99%. En el seguimiento posterior se diagnosticaron 13 recidivas más, considerando entonces un total de 14 fracasos de tratamiento, y por tanto una respuesta definitiva a tratamiento del 87%.

Como era previsible, la proporción de recidivas fue mayor en pacientes inmunodeprimidos (20.6% en global) que en inmunocompetentes (9.6%). Las características detalladas de los pacientes inmunocompetentes que recidivaron se presentan en la Tabla 12:

Tabla 12. Características de los pacientes IC que recidivaron.

Sexo, edad	País de nacimiento	Etnia negra	Días hasta recidiva	Tto	Dosis inicial (mg/kg)	Dosis retratamiento (mg/kg)	Evolución tras 6 meses del retratamiento
Varón, 38	España	No	270	ABL	15	35	Curado
Varón, 95	España	No	30	ABL	18	30	Curado
Varón, 15	España	Sí	60	ABL	18	30	Curado
Mujer, 37	Guinea E.	Sí	115	ABL	18	21	Curado
Mujer, 64	Guinea E.	Sí	97	ABCL	21	30 (ABL)	Curado
Varón, 34	Guinea E.	Sí	165	ABL	21	20 (ABL + Miltefosina)	Curado
Varón, 39	Nigeria	Sí	71	ABL	21	40	Curado

ABL: Anfotericina B liposomal. ABCL: Anfotericina B complejo lipídico.

1 paciente inmunocompetente y 1 inmunodeprimido recidivaron más allá de los 6 meses tras finalizar el tratamiento, todos ellos durante el primer año.

5 de los 7 pacientes tratados que recidivaron eran originarios o descendientes de sub-saharianos. Considerando solo los pacientes con LV inmunocompetentes, la

probabilidad de recidiva en este grupo fue del 5/42 (11.9%) frente a 2/31 (6.5%) del resto (p=0.359).

Durante el seguimiento del resto de los pacientes inmunocompetentes curados que no recidivaron, cabe destacar el caso de una mujer de 46 años, originaria de Guinea Ecuatorial, que un año después de resolverse su LV (tratada con 21 mg/kg de Anfotericina B liposomal) presentó una leishmaniasis cutánea. Este caso no se consideró una recidiva, sino una reinfección por *Leishmania*, y se resolvió tras tratamiento con 10mg/kg de ABL.

En el análisis multivariante para determinar los factores pronósticos independientes asociados a fracaso o recidiva tras tratamiento de la LV en los pacientes inmunocompetentes, la única variable relacionada con recidiva fue el tratamiento incorrecto según las guías clínicas (dosis al menos 21mg/kg), OR 16.9 (2.6-111), p=0.003.

Variables en la ecuación									
		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
								Inferior	Superior
Paso 1 <sup>a</sup>	Dosiscorrecta	-2,833	,965	8,619	1	,003	,059	,009	,390
	Constante	,000	,816	,000	1	1,000	1,000		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: Dosiscorrecta.

Variables que no están en la ecuación <sup>a</sup>					
			Puntuación	gl	Sig.
Paso 1	Variables	Sexo	,112	1	,737
		Edad	,059	1	,808
		Etnia negra	,217	1	,641
		Retraso inicio de tto	,501	1	,479
		Ferritina	,023	1	,879
		Hemofagocítico	,344	1	,558

a. No se calculan los chi-cuadrado residuales a causa de las redundancias.

### **1.2.7. Tratamiento y efectos adversos**

Como efectos adversos relacionados con el tratamiento se objetivó deterioro de la función renal (definido como aumento de creatinina basal más de 0.5 mg/dl durante el tratamiento) en 35 pacientes (34%), reversible en todos los casos, y tiritona y escalofríos en 10 (9.4%), con porcentajes similares tanto en inmunocompetentes como en inmunodeprimidos.

Para valorar la eficacia y tolerancia de los diferentes tratamientos de la LV empleados en nuestra muestra se compararon los resultados de todos los pacientes tratados con anfotericina B liposomal (ABL) y con anfotericina B complejo lipídico (ABCL), aunque únicamente 6 de ellos fueron tratados en total con ABCL, incluyendo 2 antes del inicio del brote (como veremos en el apartado siguiente). Solo el 12.3% de los pacientes con ABL presentaron escalofríos frente al 50% de los tratados con ABCL ( $p < 0.001$ ). No hubo diferencias en la incidencia de fracaso renal (32.5% con ABL vs 40% con ABCL,  $p = 0.351$ ). En global, 3 de los 6 pacientes en los que se utilizó ABCL recidivaron.

### **1.3. LEISHMANIASIS VISCERAL TÍPICA (LV). COMPARACIÓN CON LOS CASOS ANTERIORES AL BROTE**

Desde la apertura del Hospital Universitario de Fuenlabrada en 2004, y hasta el inicio del brote epidémico, se habían atendido un total de 11 pacientes con leishmaniasis. Al igual que durante el brote epidémico, la mayoría de los pacientes (81.8%, 9 pacientes) se presentaron como una LV típica, y el resto (18.2%, 2 pacientes) como una LLL. No hubo ninguna LM.

Respecto a la LV típica, se presentan las características epidemiológicas y su comparación con los casos tras el inicio del brote en la Tabla 13.

Hay que subrayar que, del total de pacientes con LV antes del brote, no hubo ninguno inmunodeprimido por tratamiento inmunosupresor, que durante el brote suponen el 13.5% del total, y un paciente con neoplasia maligna fue el único inmunodeprimido no VIH.

Es destacable que el tiempo medio desde el comienzo de los síntomas hasta que se logró el diagnóstico y se inició el tratamiento se redujo desde una mediana de 49.5 días (media 77.3, desviación típica 75.8, rango 5-240) antes del brote, hasta los 20 días durante el brote (media 33.6, desviación típica 56.5, rango 1-425) ( $p=0.036$ ). A este descenso, además de la mayor sospecha diagnóstica, contribuye sobre todo la utilización del test de diagnóstico rápido rk39-ICT, que comenzó a utilizarse en el Hospital de Fuenlabrada a mediados de 2011. Lo comprobamos si comparamos el tiempo de retraso en el diagnóstico de todos los pacientes antes de la utilización del

Tabla 13. Características epidemiológicas, clínicas, resultados de laboratorio y pruebas diagnósticas de todos los pacientes con LV, comparando los casos anteriores con los del brote epidémico.

	<b>Antes del brote (9)</b>	<b>Brote (110)</b>	<b>P</b>
<b>Inmunocompetentes</b>	4 (44.4%)	75 (68.2%)	0.140
<b>Co-infección por VIH</b>	4 (44.4%)	11 (10%)	<b>0.015</b>
<b>Varones (n,%)</b>	8 (88.9%)	79 (71.8%)	0.246
<b>Edad (media)</b>	43.6	45.3	0.762
<b>Inmigrantes (n,%)</b>	5 (55.6%)	58 (52.7%)	0.575
<b>Etnia negra (n,%)</b>	3 (33.3%)	50 (45.5%)	0.366
<b>Fiebre (n,%)</b>	7 (77.8%)	104 (94.5%)	0.112
<b>Cefalea (n,%)</b>	2 (22.2%)	33/109 (30.3%)	0.467
<b>Esplenomegalia clínica (n,%)</b>	5 (55.6%)	34/109 (31.2%)	0.131
<b>Esplenomegalia radiológica (n,%)</b>	7 (77.8%)	97/104 (93.3%)	0.151
<b>Anemia (Hb&lt;12 mg/dl) (n,%)</b>	7 (79.8%)	95/109 (87.2%)	0.351
<b>Leucopenia (&lt;4000/mm<sup>3</sup>) (n,%)</b>	9 (100%)	98/109 (89.9%)	0.401
<b>Trombopenia (&lt;150000/mm<sup>3</sup>) (n,%)</b>	8 (88.9%)	103/109 (94.5%)	0.481
<b>PCR &gt; 2 mg/dl *</b>	4/7 (57%)	97/106 (91.5%)	<b>0.026</b>
<b>Ferritina &gt; 300 mg/dL *</b>	5/5 (100%)	89/93 (95.7%)	0.808
<b>VSG &gt; 30 mm/h *</b>	7/7 (100%)	54/61 (88.5%)	0.450
<b>VSG &gt; 60 mm/h *</b>	6/7 (85.7%)	38/61 (62.3%)	0.214
<b>Síndrome hemofagocítico (n, %)</b>	1 (11.1%)	42 (38.2%)	<b>0.047</b>
<b>ELISA/IFI*</b>	7/7 (100%)	104/108 (96.3%)	0.775
<b>Microscopía óptica* (médula ósea)</b>	3 (33.3%)	45/104 (43,3%)	0.417
<b>Cultivo* (médula ósea)</b>	1/2 (50%)	12/37 (32.4%)	0.561
<b>PCR* (médula ósea)</b>	2/3 (67%)	92/99 (92.9%)	0.219

\* número pacientes con resultado positivo/número de pacientes con test realizado (%)

test rápido, con una mediana de 30 días (media 46.1, desviación típica 45.8, rango 5-240) antes del uso del test, hasta una mediana de 17 días desde el uso del test rápido (media 32.9, desviación típica 62.7, rango 1-425) ( $p=0.010$ ) (Figura 12).

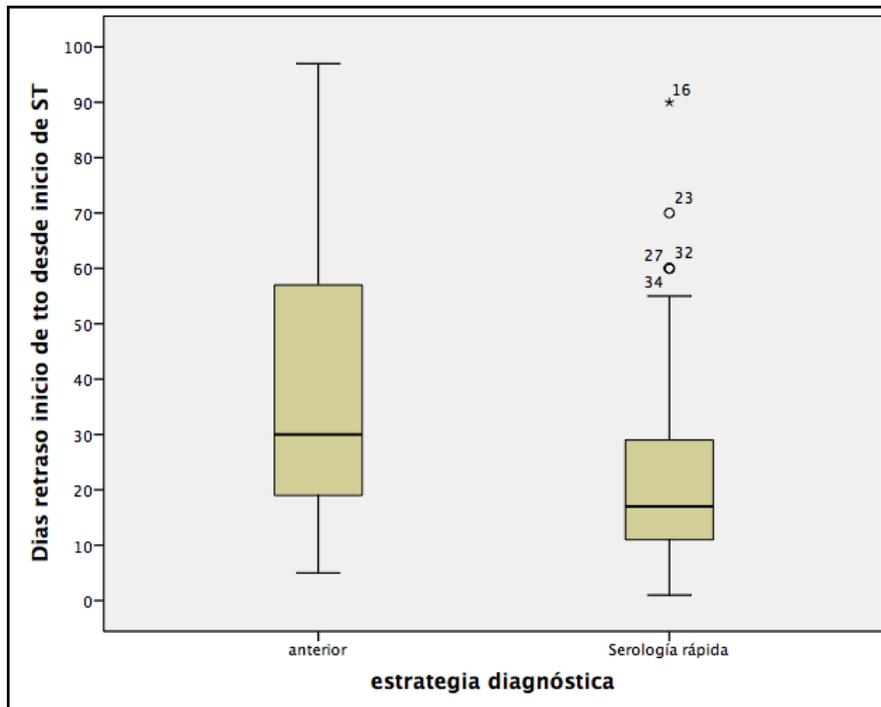


Fig. 12. Días de retraso en el diagnóstico (mediana y rango intercuartílico) antes y después de la utilización del test rápido rk-39-ICT.

Respecto al tratamiento, 1 paciente VIH se perdió sin haber recibido ningún tratamiento. 6 se trataron con anfotericina B liposomal (ABL) y los otros 2 con anfotericina B complejo lipídico (ABCL). La respuesta a final de tratamiento fue del 100%, aunque posteriormente hubo 3 recaídas (37.5% de los tratados). 2 de ellas fueron pacientes VIH que recaeraron durante la profilaxis (uno de ellos la había abandonado); la otra recaída fue un paciente inmunocompetente que se había tratado con ABCL a una dosis de 15mg/kg, y posteriormente volvió a enfermar tras un ciclo prolongado de esteroides un año después de su aparente curación. Destacar que

el segundo paciente tratado con ABCL tuvo que suspender el tratamiento por mala tolerancia, por lo que completó tratamiento con ABL sin incidencias. De los pacientes tratados con ABL solo uno tuvo que suspender el tratamiento por efectos secundarios (toxicodermia), siendo sustituido por Pentamidina. La comparativa entre todos los pacientes tratados con ABL vs ABCL ya ha sido comentada en el apartado anterior (1.2.7).

## OBJETIVO 2: PRESENTACION ATÍPICA. LEISHMANIASIS

### GANGLIONAR

#### **2.1. LEISHMANIASIS GANGLIONAR (LLL) DURANTE EL BROTE.**

##### COMPARACIÓN CON LEISHMANIASIS VISCERAL TÍPICA (LV)

Desde el inicio del brote epidémico en 2009 se han diagnosticado 28 pacientes que cumplen los criterios de caso de leishmaniasis ganglionar. Si los comparamos con los 110 pacientes con leishmaniasis visceral típica observamos varias diferencias. Las características clínicas, epidemiológicas, resultados de laboratorio, test diagnósticos, tratamiento inicial y su respuesta aparecen resumidas en la Tabla 14.

Se puede comprobar como existen diferencias significativas en prácticamente todas las variables analizadas.

Tabla 14. Características clínicas, epidemiológicas, resultados de laboratorio, test diagnósticos, tratamiento inicial y respuesta de los pacientes comparando LV típica con LLL.

	LV (n=110)	LLL (n=28)	TOTAL (n=138)	P
Varones (n,%)	79 (71.8%)	15 (53.6%)	94 (68.1%)	0.064
Edad (media ± DS)	45.25 ± 16.2	44.93 ± 14.2	45.18 ± 15.7	0.925
Inmigrantes (n,%)	58 (52.7%)	6 (21.4%)	64 (46.4%)	<b>0.003</b>
África subsahariana (n,%)	45 (40.9%)	3 (10.7%)	48 (34.8%)	<b>0.016</b>
Raza negra (n,%)	50 (45.5%)	3 (10.7%)	53 (38.4%)	<b>0.001</b>
Inmunocompetente (n,%)	83 (75.5%)	28 (100%)	111 (80.4%)	<b>0.003</b>
Fiebre (n,%)	104 (94.5%)	0 (0%)	104 (75.4%)	<b>&lt;0.001</b>
Esplenomegalia clínica (n,%)	34 (31.2%)	1 (3.6%)	35 (25.5%)	<b>0.003</b>
Esplenomegalia radiológica (n,%)	97/104 (93.3%)	1/13 (7.7%)	98/117 (83.8%)	<b>&lt;0.001</b>
Adenopatías (n,%)	3 (2.8%)	28 (100%)	31 (22.5%)	<b>&lt;0.001</b>
Lesión cutánea (n,%)	0 (0%)	8 (28.6%)	8 (5.8%)	<b>&lt;0.001</b>
Anemia (Hb<12 mg/dl) (n,%)	95 (87.2%)	2 (7.1%)	97 (70.8%)	<b>&lt;0.001</b>
Leucopenia (<4000/mm3) (n,%)	98 (89.9%)	2 (7.1%)	100 (73%)	<b>&lt;0.001</b>
Trombopenia (<150000/mm3) (n,%)	103 (94.5%)	1 (3.6%)	104 (75.9%)	<b>&lt;0.001</b>
PCR > 2 mg/dL	97/106 (91.5%)	1/25 (4%)	98/131 (74.8%)	<b>&lt;0.001</b>
PCR > 10 mg/dL	55/106 (51.9%)	0/25 (0%)	55/131 (42%)	<b>&lt;0.001</b>
Ferritina > 300 mg/dL	89/93 (95.7%)	3/16 (14.7%)	92/109 (84.4%)	<b>&lt;0.001</b>
Ferritina > 1000 mg/dL	68/93 (73.1%)	0/16 (0%)	68/109 (62.4%)	<b>&lt;0.001</b>
VSG > 30 mm/h	54/61 (88.5%)	2/12 (16.7%)	56/73 (76.7%)	<b>&lt;0.001</b>
VSG > 60 mm/h	38/61 (62.3%)	0/12 (0%)	38/73 (52.1%)	<b>&lt;0.001</b>
Test rk39-ICT	38/84 (45.2%)	3/10 (30%)	41/94 (43.6%)	<b>0.358</b>
ELISA/IFI	104/108 (96.3%)	14/22 (63.6%)	118/130 (90.8%)	<b>&lt;0.001</b>
Tto inicial (Anfo B Liposomal)	103 (93.6%)	26 (92.9%)	129 (93.5%)	0.329
Ef.2º: Tiritona	10/106 (9.4%)	7/26 (26.9%)	17/132	<b>0.033</b>
Ef.2º: FRA	35/103 (34%)	6/23 (26.1%)	41/126 (32.5%)	0.465
Dosis correcta guías	96/106 (90.6%)	8/27 (29.6%)	104/133 (78.2%)	<b>&lt;0.001</b>
Fracaso o recidiva	14/107 (13.1%)	1 (3.6%)	15/135 (11.1%)	0.195

Número pacientes con resultado positivo/número de pacientes con prueba realizada o dato recogido (%)

## 2.2. LEISHMANIASIS GANGLIONAR (LLL). DESCRIPCIÓN

### 2.2.1 Distribución por años

Desde la apertura del Hospital de Fuenlabrada en 2004 y antes de la declaración del brote, se habían presentado 2 casos de LLL. Por tanto, hasta la fecha se han atendido 30 pacientes incluyendo los 28 del brote epidémico, sin haberse encontrado diferencias clínicas estadísticamente significativas entre los pacientes atendidos antes y durante el brote. Por lo tanto, dicha descripción en cuanto a sus características clínicas generales no difiere de la que puede observarse en la Tabla 14.

En la Figura 13 se muestra el año de diagnóstico de todos los casos de LLL.

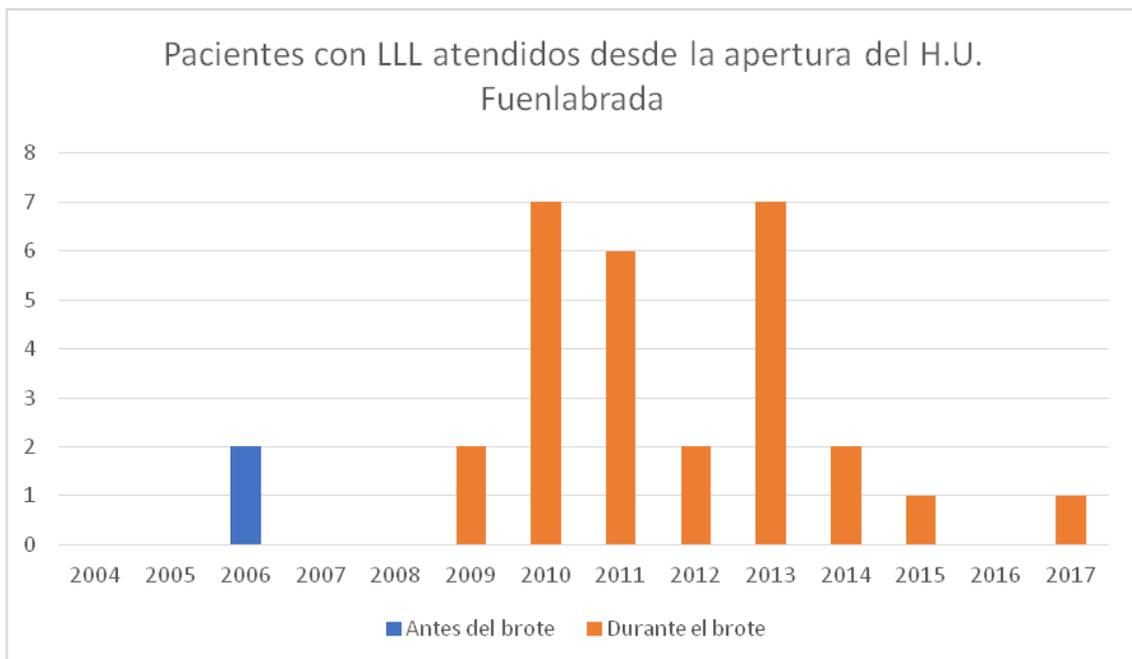


Fig. 13. Pacientes con LLL atendidos por año de diagnóstico.

### 2.2.2 Características clínicas de la leishmaniasis ganglionar

Se presentan en la Tabla 14 (ver apartado 2.1).

Entrando en más detalle, la edad de los pacientes está comprendida entre los 21 y los 72 años, con la siguiente distribución por décadas:

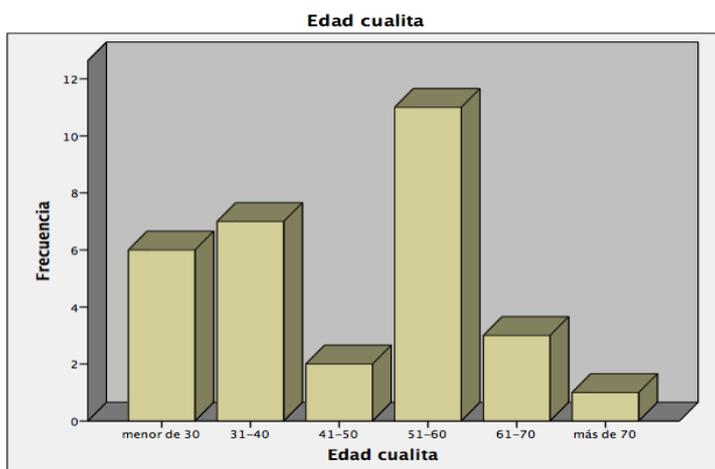


Fig. 14. Pacientes con LLL en función de su grupo de edad.

El 80% de los pacientes (24) son de nacionalidad española, el resto se dividen en: 2 pacientes procedentes de Nigeria (6.7%); otros 2 de Rumanía (6.7%); uno de Guinea Ecuatorial (3.3%); y otro de China (3.3%).

Todos los pacientes con LLL se presentaron como adenopatías de larga evolución (mediana de 60 días, con un rango entre 14 y 210 días) y ningún paciente presentó fiebre ni ningún otro síntoma sistémico en ningún momento de la evolución.

15 pacientes (50%) presentaron más de una adenopatía, de los cuales 2 (6.7% del total de LLL) tenían adenopatías en diferentes territorios ganglionares. La localización más frecuente de las adenopatías fue en el área cervical (20 casos, 66.7%), incluyendo cadenas laterocervical, submandibular, parotídea, preauricular o retroauricular. 4 pacientes (13.3%) presentaron adenopatías inguinales, 3 (10%) en

región axilar y 1 (3.3%) supraclavicular (Figura 15). 8 pacientes (26.7%) presentaron de forma concomitante lesión cutánea sospechosa de leishmaniasis.

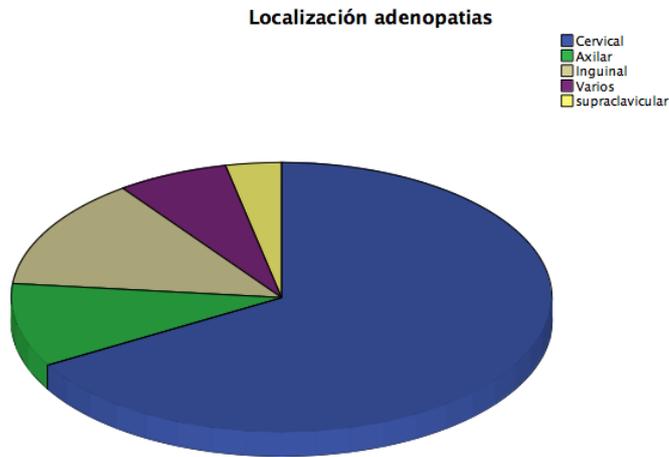


Fig. 15. Localización de adenopatías en los pacientes con LLL.

En una paciente de 35 años con LLL exclusivamente supraclavicular en la primera visita se documentó la aparición de nuevas adenopatías inguinales al final del tratamiento, confirmándose por PAAF la presencia de *Leishmania* en ambos territorios ganglionares, supraclavicular e inguinal. Esta paciente era la única con LLL donde se objetivó esplenomegalia clínica y radiológica (Tabla 14), además de pancitopenia. Como dato clínico relevante esta paciente presenta un Síndrome de Noonan (en adelante, paciente A).

El otro paciente que presentó anemia y leucopenia fue una mujer de 40 años (en adelante, paciente B) de raza negra y origen nigeriano, que se presentó con adenopatías submaxilares derechas, concretamente en región infraparotídea.

### **2.2.3 Diagnóstico de la leishmaniasis ganglionar**

El diagnóstico inicial se realizó en todos los casos de LLL por PAAF de la adenopatía, confirmándose con el hallazgo de linfadenitis granulomatosa no necrotizante con presencia de *Leishmania* en la mayoría de los casos (26 pacientes, 86,7%). En 2 pacientes (6.7%) se encontró *Leishmania* sin granulomas. Los otros 2 pacientes (6.7%) presentaron una linfadenitis granulomatosa no necrotizante sin objetivarse *Leishmania* en la PAAF, aunque en uno de ellos sí fue positiva la PCR para *Leishmania*. El otro paciente fue el paciente B (ver apartado anterior), y presentó ELISA/IFI positivo para *Leishmania*.

Destacar que a uno de los primeros pacientes con LLL diagnosticados antes del brote con PAAF con linfadenitis granulomatosa no necrotizante con presencia de *Leishmania* y que no fue tratado, se le realizó una biopsia semanas después del diagnóstico inicial para descartar otras patologías. El hallazgo de la biopsia fue la presencia de linfadenitis granulomatosa necrotizante sin *Leishmania*, resolviendo el cuadro espontáneamente.

Respecto a los test serológicos realizados en estos pacientes (Tabla 14): Se realizó serología rápida (rk39-ICT) en 10 pacientes siendo positiva en 3 (30%); ELISA/IFI en 24 pacientes, siendo positiva en 18 (66.6%); se realizó PCR para *Leishmania* en 5 casos en el ganglio, siendo todos positivos (100%), mientras que la PCR en sangre se realizó en 3 pacientes siendo todos negativos (0%). No se realizó aspirado de médula ósea en ningún paciente.

#### 2.2.4 Tratamiento de la leishmaniasis ganglionar

3 pacientes (10%) no llegaron a recibir ningún tratamiento por resolución espontánea de las adenopatías durante el proceso diagnóstico. Se documentó la desaparición de las adenopatías a los 5 meses, a los 12 meses y a los 15 meses desde el inicio aproximado de los síntomas, y a los 3 meses y 15 días, 2 meses, 3 meses y 3 semanas desde la última exploración donde se documentaban adenopatías. El resto (90%) se trataron con Anfotericina B liposomal. Las dosis de tratamiento utilizadas y la respuesta de los pacientes se reflejan a continuación en la Tabla 15:

Tabla 15. Dosis de tratamiento (ABL) y evolución de los pacientes con LLL.

Dosis	LLL (n=30)	Curados fin de tratamiento	Curados a los 6 meses
No tratamiento	3 (10%)	3 (100%)	3 (100%)
≤ 10 mg/Kg	10 (33.3%)	10 (100%)	10 (100%)
15 mg/Kg	7 (23.3%)	7 (100%)	7 (100%)
18 mg/Kg	2 (6.7%)	2 (100%)	2 (100%)
21 mg/Kg	8 (26.7%)	7 (87.5%)	8 (100%)

ABL: Anfotericina B liposomal.

Se consideró no curada la paciente que presentó aparición de nuevas adenopatías al finalizar el tratamiento (Paciente A, ver apartado 2.2.2). Esta paciente se retrató con Anfotericina B liposomal a dosis de 40 mg/kg, con resolución completa del cuadro

No se ha producido ninguna recidiva hasta ahora, con una media de seguimiento de 69.5 meses (mínimo 2.8, máximo 133.5).

Situación a los 6 meses de fin de tto

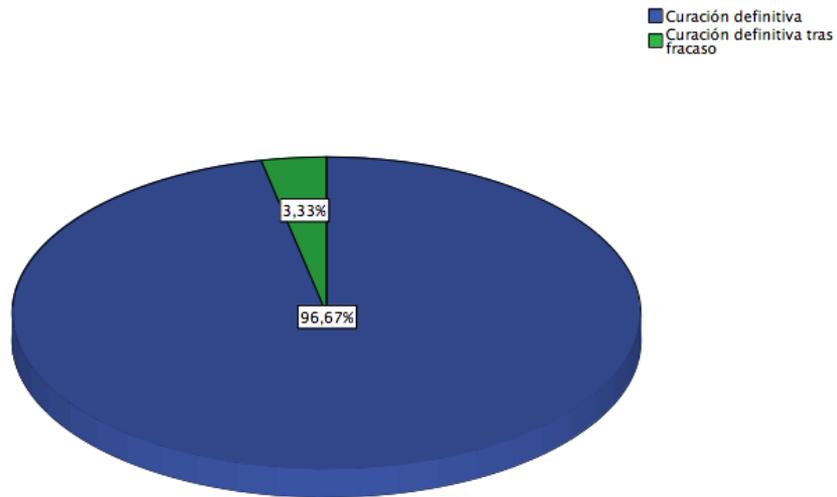


Figura 16. Outcome del tratamiento de los pacientes con LLL.

### OBJETIVO 3: MARCADORES CELULARES DE CURA EN LLL

Como se ha comentado en el apartado de Material y Métodos, dentro del estudio de biomarcadores en diferentes formas clínicas de *Leishmania*, se recogieron muestras de sangre de 6 pacientes con leishmaniasis ganglionar (LLL) antes del tratamiento (pacientes enfermos), y de 21 de estos pacientes a los 6 meses tras finalizar el tratamiento (pacientes curados).

Los resultados de los test se presentan en la Tabla 16 y en la Figura 17.

Tabla 16. Porcentaje de resultados positivos en test parasitológicos, serológicos e inmunológicos en pacientes con leishmaniasis activa (A) y curada (C).

	PCR (%)		rK39 (%)		IFAT $\geq 1/40$ (%)		SLA-CPA (%)		IFN- $\gamma$ (%)	
	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
LLL	0	5	33	48	20	16	67	81	100	100

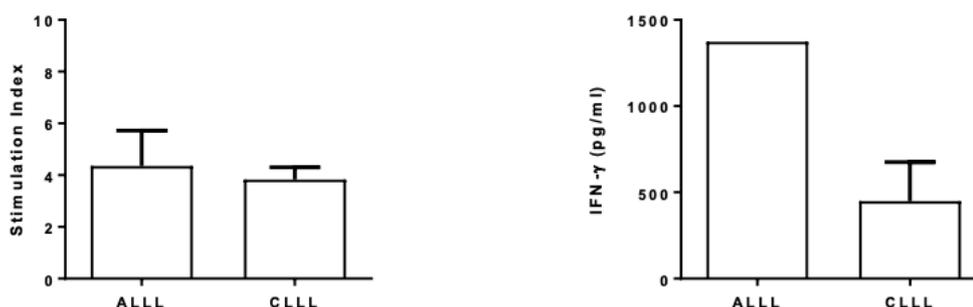


Fig. 17. Comparación de la respuesta linfoproliferativa a SLA de PBMCs (SLA-CPA) y de IFN-gamma en pacientes enfermos y curados de LLL.

ALLL: LLL activa.

CLLL: LLL curada.

Hay que destacar que los test serológicos y parasitológicos en sangre (PCR, rK39 y IFAT) presentaron resultados positivos en porcentajes muy bajos en la LLL activa: 0% PCR, 33% rK39, 20% IFAT.

Los estudios inmunológicos, por su parte, no mostraron diferencias en sus resultados entre los pacientes enfermos y curados, observándose cifras elevadas de linfoproliferación y de interferón gamma incluso antes del tratamiento (67% positivos SLA-CPA y 100% del IFN- $\gamma$ ).

# DISCUSIÓN



En este trabajo presentamos nuestra experiencia clínica acerca del mayor brote epidémico de leishmaniasis (*L. infantum*) que se ha descrito hasta la fecha en Europa, centrándonos en la mayoritaria afectación que se ha observado de pacientes a priori inmunocompetentes y, más concretamente, en una forma de presentación que se ha dado en estos pacientes con relativa frecuencia, hasta ahora considerada una forma atípica y prácticamente excepcional de leishmaniasis visceral (LV): la leishmaniasis ganglionar (en inglés localized leishmanial lymphadenopathy, LLL). No en balde se trata de la mayor serie de casos de esta entidad descrita en la literatura.

## DESCRIPCIÓN CLÍNICA DEL BROTE. Leishmaniasis visceral en inmunocompetentes

Como hemos visto, a partir del año 2009 se ha producido un aumento considerable en el número de pacientes con leishmaniasis atendidos en el Hospital Universitario de Fuenlabrada y, consecuentemente, también de su forma de presentación más grave, la leishmaniasis visceral (LV). En el año 2011 se produjo el pico máximo de incidencia en nuestra serie de leishmaniasis no cutánea, coincidiendo con el mayor número de casos de todas las formas de leishmaniasis observados en toda la Comunidad de Madrid (60) (Figura 18).

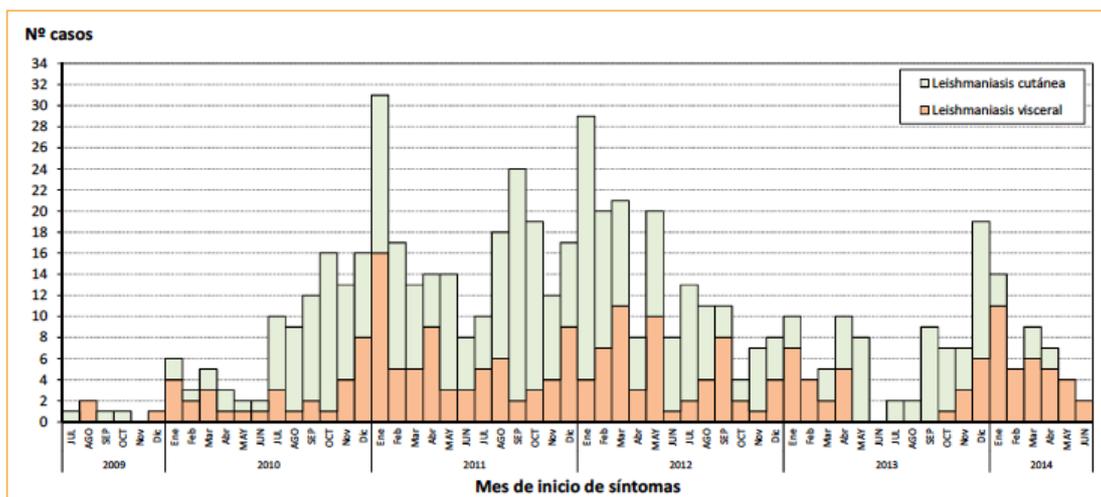


Fig. 18. Brote comunitario de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. 2009-2015. Curva epidemiológica según forma de presentación, por mes de inicio de síntomas (julio-2009-junio 2014).

Fuente: Dirección General de Salud Pública. Subdirección General de Sanidad Ambiental.

Tras las medidas adoptadas desde la comunidad de Madrid para la contención del brote, el número de casos atendidos ha ido disminuyendo paulatinamente hasta la actualidad, aunque se mantiene por encima del umbral epidémico.

### Características epidemiológicas

En primer lugar debemos destacar que en el global de nuestra serie ha habido un predominio de afectación en varones (68%) que es independiente del status inmunológico, ya que se observa tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Prácticamente en todas las series de leishmaniasis visceral descritas hasta la fecha es unánime la afectación predominante en los varones (38)(61)(62)(63)(64)(65) llegando a ser en alguna de ellas de forma casi exclusiva (39), como se observa también en nuestra propia serie de pacientes antes del brote. Este hecho también se ha objetivado en las series descritas de leishmaniasis cutánea, al menos en Sudamérica (66), motivo por el que se solía relacionar este predominio con

un factor de exposición más que con un mayor riesgo de enfermedad en varones: Los varones se infectarían más que las mujeres al estar más expuestos ya que son los que trabajan fuera de casa en los medios rurales endémicos de leishmaniasis y, por tanto, más expuestos a la picadura de los flebotomos (66)(67).

Sin embargo, existen datos en nuestra experiencia y en la literatura para hacer pensar en un riesgo real más alto en varones de padecer la forma grave de leishmaniasis. Así, al comparar la forma visceral y ganglionar de nuestra serie, vemos que el predominio en varones es exclusivamente a expensas de la LV, ya que en los pacientes con LLL la proporción es cercana al 50%. La forma ganglionar, típica de inmunocompetentes y más parecida a la LC que a la LV, no muestra un predominio por género, lo que sugiere que en un medio como el nuestro donde no se esperan diferencias en la exposición en función del género, la proporción de varones/mujeres afectados con leishmaniasis debería estar en torno al 50%. A favor de ello, el hecho de que no se encontraran factores de riesgo de exposición en el estudio de Salud Pública de la comunidad de Madrid realizado durante el brote (51). Además, la serie de leishmaniasis cutánea publicada por los dermatólogos de nuestro centro tampoco mostró diferencias en función del género (68), de la misma manera que nuestra serie de LLL, es decir, la exposición sería similar en ambos sexos. Finalmente, estudios de exposición realizados por nuestro grupo en pacientes asintomáticos inmunodeprimidos tampoco mostraron diferencias significativas entre hombres y mujeres (55). Es decir que, si encontramos que la proporción de varones con LV es superior al de mujeres, es porque debe haber un factor intrínseco a los varones que los pone en mayor riesgo de LV.

Un estudio en animales (hámster) a los que se provocaron leishmaniasis cutáneas mostró lesiones de mayor tamaño en los machos, además de lesiones de menor tamaño en los ratones machos pre-púberes frente a los machos adultos, y lesiones de mayor tamaño en hembras tratadas con testosterona frente a hembras controles. Estas diferencias se asociaban a alteraciones en los niveles de ciertas citoquinas implicadas en la leishmaniasis como IL-4 ó TGF- $\beta$  (69). Estos resultados se han encontrado en estudios similares (65), mientras que en series de casos de niños menores de 13 años se ha mostrado una afectación por géneros del 50% (70).

Existe evidencia de que la testosterona y la progesterona reducen la actividad NK, y alteran la producción de TNF y NO por los macrófagos, todos ellos mecanismos importantes en la defensa del organismo frente a *Leishmania*. Además, ambas hormonas promueven la acción de IL-10 e IL-4, que favorecen la respuesta THelper-2 característica de la LV (65).

Por el contrario, el estrógeno se considera un mediador pro-inflamatorio de la vía THelper-1, que estimula la producción de TNF o interferón-gamma (INFg) y que es la que nos protege de los microorganismos intracelulares como *Leishmania* (65). Estas diferencias entre la testosterona y el estrógeno explicarían la mayor incidencia de enfermedades autoinmunes en mujeres, pero también la de leishmaniasis visceral (y otras enfermedades parasitarias) en varones (71).

Respecto a la distribución por edades, comprobamos que se han visto afectados todo tipo de pacientes independientemente de la edad, en nuestro caso entre los 15 y los 95 años, con una media en torno a los 45 años tanto en las formas viscerales como ganglionares, sin diferencias por el status inmunológico. En zonas

endémicas, la mayoría de los pacientes con leishmaniasis son niños (38)(61)(62)(64)(72), reflejo de que la población se va inmunizando con la edad y disminuyendo el riesgo de enfermar. Sin embargo, en áreas donde la leishmaniasis se ha introducido recientemente se espera una afectación similar en todos los estratos de edades, reflejo de una falta de inmunidad de la población expuesta (38)(61). De la misma manera ocurre con los brotes epidémicos, como se ve en nuestra serie. La distribución por edades de los pacientes con leishmaniasis visceral (Figura 19) es un reflejo de la pirámide de la población de Fuenlabrada en el momento del pico del brote (Figura 20), en el contexto de una exposición a los flebotomos infectados de una gran parte de la población.

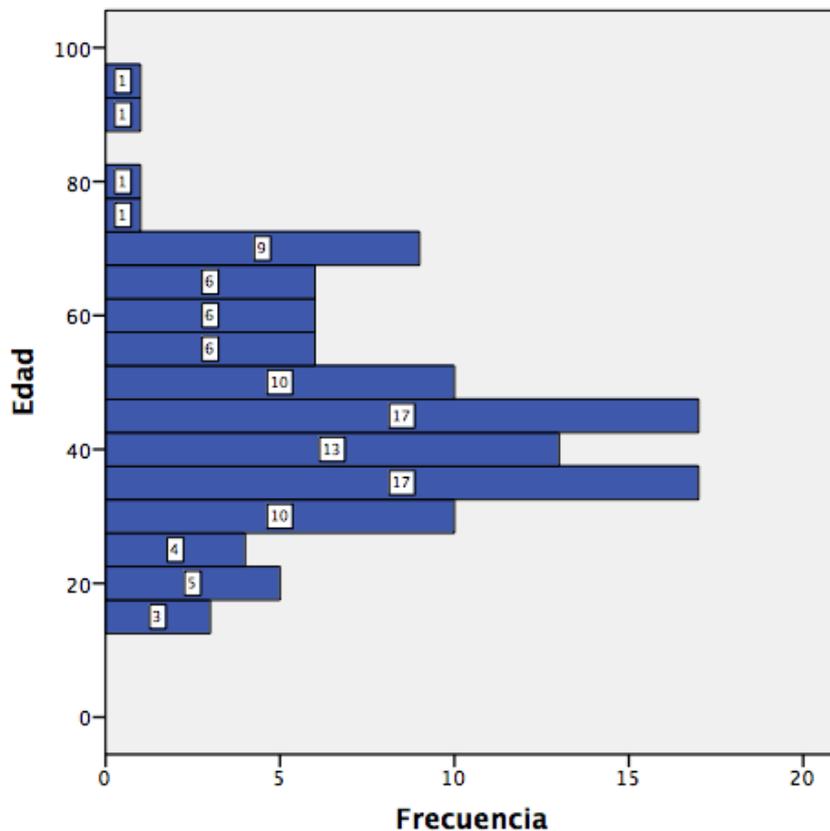


Fig. 19. Distribución por edades de los pacientes con LV durante el brote epidémico.

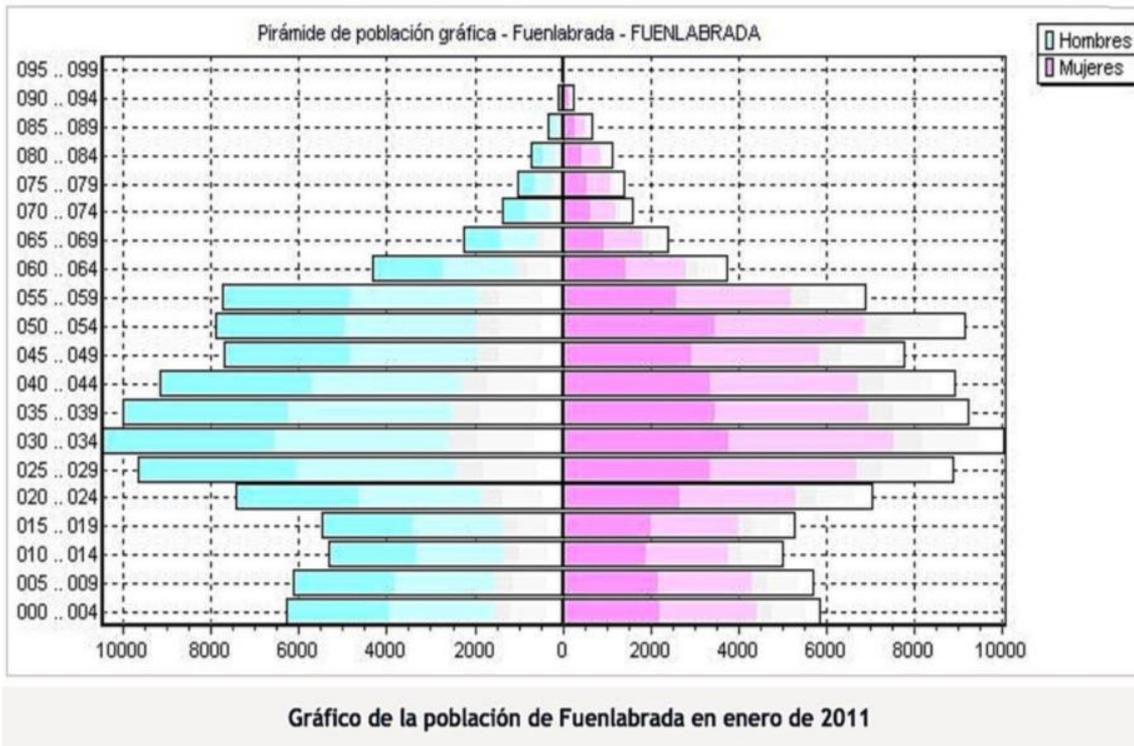


Fig. 20. Pirámide poblacional de Fuenlabrada en 2011 (Fuente: Ayuntamiento de Fuenlabrada)

Podemos destacar una sutil diferencia al comparar el pico de edad de la forma visceral, que está por debajo de los 50 años, con el pico tanto de la forma ganglionar que presentamos (LLL) como de la LC (68), que está entre los 50 y los 60 años. Este acúmulo de casos de las formas benignas de leishmaniasis entre los 50 y los 60 años podría indicar cierto grado de inmunidad previa en la población de más edad que evita la progresión de la forma visceral.

Para finalizar con las características epidemiológicas el hecho más llamativo es, sin duda, la alta proporción de pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral que son inmigrantes de origen sub-sahariano. Más aun teniendo en cuenta que la población extranjera que vive en Fuenlabrada apenas supera el 13% del total. Sería comprensible si habláramos de una enfermedad importada, pero es bien

conocido que la leishmaniasis es una enfermedad endémica en España al igual que en toda la cuenca mediterránea, y apenas se ha reportado en países sub-saharianos con excepción de Sudán del Sur y Etiopía (73), aunque nuestros pacientes provienen mayoritariamente de Nigeria y Guinea Ecuatorial, donde no se ha descrito la enfermedad (73). Además, todos estos pacientes llevaban más de 6 meses residiendo en nuestro país, siendo en muchos casos personas afincadas en Fuenlabrada desde hace años.

Las razones de este elevado número de pacientes afectados podrían ser múltiples. Por un lado, factores externos (hábitos de vida, condiciones o localización del hogar) que implicaran una exposición mayor de los pacientes subsaharianos a los flebotomos. Sin embargo, los estudios epidemiológicos realizados en la zona no han encontrado ningún factor de exposición llamativo (51), como pudiera ser el contacto con perros, la presencia de más vectores en su medio cercano o cualquiera de los factores de riesgo clásicos. Otra explicación razonable, como ya se ha comentado, podría ser que a los pacientes provenientes de regiones donde la leishmaniasis no es endémica, la falta de exposición previa pueda hacerles más susceptibles a enfermarse una vez entran en contacto con el parásito. Si este fuera el caso, también debería haber un gran número de pacientes subsaharianos afectados con otras formas de presentación. Sin embargo, se han reportado muy pocos casos de LC en pacientes subsaharianos (68) y en nuestra serie tampoco hemos tenido apenas casos de LLL en este grupo, lo que va en contra tanto del factor de exposición como de la falta de inmunidad adquirida. Por tanto, aunque parece evidente que la cuestión geográfica debe tener su influencia, no podemos descartar la implicación de factores genéticos intrínsecos que hagan a esta población más susceptible a padecer la forma visceral de

la leishmaniasis, como otros autores han sugerido (74), y como también lo apoya el hecho de que en una serie de pacientes pediátricos afectados durante este brote, la mitad de ellos fueran de raza negra, siendo todos nacidos en España (75). Por aportar más información sobre las peculiaridades inmunitarias en la población sub-sahariana, se ha relacionado la neutropenia étnica con cierta protección para la malaria (76), y se han encontrado asociaciones entre determinados polimorfismos genéticos más frecuentes en afroamericanos y el riesgo de síndrome hemofagocítico (77).

### **Status inmunológico**

Es bien conocido que la inmunodepresión es uno de los factores de riesgo más importantes para padecer la enfermedad, sobre todo en su forma visceral (23), y desde la aparición del VIH la coinfección VIH-leishmaniasis ha sido muy frecuente, encontrando que la mayoría de pacientes diagnosticados de leishmaniasis en nuestro medio y en aquellas áreas endémicas para ambos microorganismos estaban coinfectados (12)(78). Esto concuerda con nuestros casos diagnosticados antes del brote, donde casi la mitad de pacientes con LV estaban coinfectados por el VIH.

Sin embargo, durante el brote nos hemos encontrado con un escenario distinto. La mayoría de pacientes enfermos han sido inmunocompetentes, reflejo de que son evidentemente predominantes en la población de Fuenlabrada. A pesar de que el riesgo relativo de desarrollo de LV en este grupo es mucho más bajo, al ser muchos más los pacientes inmunocompetentes expuestos el número absoluto de casos es mayor que el de otros grupos con mayor riesgo relativo. Pero, además, entre los pacientes inmunodeprimidos, han sido más frecuentes los pacientes no VIH: concretamente en nuestra serie se encontraban en tratamiento inmunosupresor un

13.5% del total de pacientes, frente al 7.8% de pacientes co-infectados por VIH. Este hecho ya ha sido advertido por diferentes autores(14)(23)(79)(80) y representa un nuevo desafío para el manejo de la enfermedad ya que, mientras los pacientes VIH pueden recuperar su inmunidad gracias a los modernos TARGA, en los pacientes trasplantados o inmunosuprimidos farmacológicamente lo habitual es que mantengan su inmunosupresión de forma indefinida, dificultando en muchos casos la curación completa.

Un pequeño porcentaje de nuestros pacientes presentaban otros elementos que podrían favorecer cierto grado de inmunodepresión, como son la cirrosis hepática y las neoplasias malignas activas. Aunque en estos pacientes no se ha descrito hasta el momento el mismo mecanismo de inmunodepresión celular que predisponga a enfermar por Leishmania, sí nos parece razonable incluirlos en este estudio dentro del grupo de inmunodeprimidos, dada la posible asociación con la enfermedad que han observado algunos autores (81), y que desde luego no se pueden considerar plenamente inmunocompetentes.

### **Comparación con otras series**

Tratar de comparar nuestra serie de leishmaniasis con otras reflejadas en la literatura es una tarea bastante compleja debido a que nuestro escenario es único al tratarse de un brote en zona urbana del primer mundo. La principal diferencia es que la población en riesgo de padecer leishmaniasis es totalmente diferente.

Como ya se ha comentado en la introducción, las zonas geográficas mundiales con leishmaniasis visceral corresponden mayoritariamente al este de la India, Sudán del Sur/oeste de Etiopía, y regiones selváticas de Brasil (3). Todas estas regiones

endémicas de leishmaniasis visceral tienen en común ser regiones pobres, motivo por el que la leishmaniasis se considera una de las “Neglected Diseases”(3). Respecto a las características epidemiológicas de los enfermos de LV de estas zonas (12)(38)(61)(63), existe, al igual que en nuestra serie, un predominio de afectación en los varones, que ya hemos comentado. Sin embargo, en estas series la mayoría de afectados son niños. Por un lado, las pirámides de edades en estos países (Figura 21), son claramente diferentes de la de nuestra población (Figura 20), mostrando un mayor predominio de niños. La elevada tasa de mortalidad infantil en estos países y el hecho de que la esperanza de vida media sea netamente inferior a la de nuestro entorno justifican por sí solas estas diferencias. Por otro lado, la población adulta ha ido adquiriendo cierto grado de inmunidad al verse expuestos en una zona endémica.

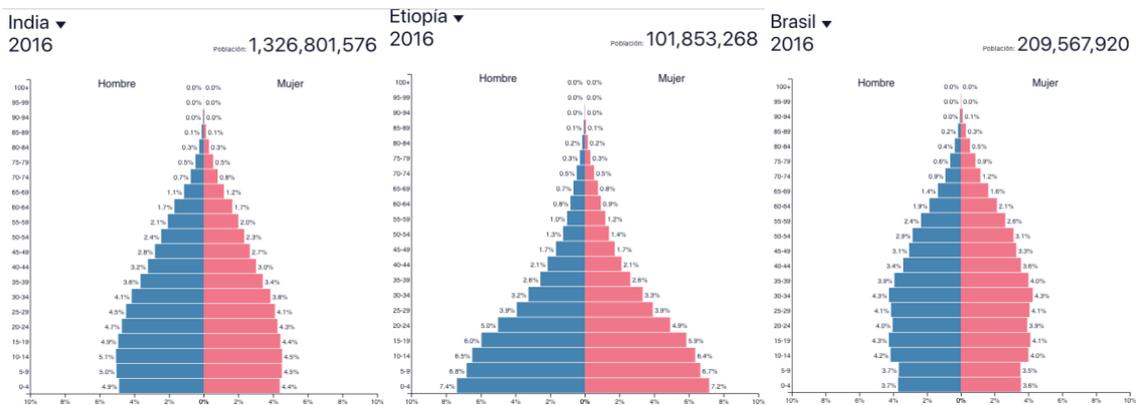


Fig. 21. Pirámides poblacionales de India (A), Etiopía (B) y Brasil (C) en 2016. (Fuente: PopulationPyramid.net) (82)

El número de pacientes que desarrollan LV en estas poblaciones también parece mayor que en nuestro entorno. El factor principal es probablemente la conocida asociación de leishmaniasis con pobreza y desnutrición(10)(17), lo que condiciona que muchos de los pacientes con LV en estas zonas no se puedan considerar del todo inmunocompetentes al estar desnutridos, especialmente los niños.

De esta manera la población susceptible de padecer LV es mucho mayor que la de nuestro entorno.

Por otra parte, hay que diferenciar las series de zonas endémicas de los brotes epidémicos. En las zonas endémicas, la población más afectada suelen ser los niños, ya que, como hemos comentado, la población adulta ha adquirido cierto grado de inmunidad. Esto explica que las series de casos de LV en inmunocompetentes en nuestro entorno, reportadas fundamentalmente en Italia, sean mayoritariamente en niños (83)(84), de forma similar a las zonas endémicas ya citadas del Tercer Mundo, mientras que el brote epidémico más importante descrito recientemente, en relación con el movimiento de población de Sudán del Sur por la guerra en este país en las décadas pasadas, y con más de 10000 enfermos de LV, haya afectado a todos los grupos de edad que provenían de zonas no endémicas de leishmaniasis (17).

Además, en las zonas endémicas es característica una alta proporción de pacientes con VIH (11)(12)(37)(38)(61), algo menor en India donde los antirretrovirales son más accesibles(63). El precario sistema sanitario en estos países no permite extender el tratamiento antirretroviral a los pacientes VIH, siendo frecuente que los pacientes co-infectados con *Leishmania* y VIH en estas zonas puedan ser tratados de su LV (única dosis, tratamiento corto) pero no tengan acceso a tratamientos antirretrovirales (38)(85), lo que condiciona evidentemente su mortalidad pero también que prácticamente toda la cohorte VIH de estas regiones esté en riesgo altísimo de LV. Finalmente, por su coste e infraestructura necesarios, el tratamiento con terapias biológicas y los trasplantes son inexistentes en estas regiones, por lo que este grupo susceptible no existe en estas zonas.

Por el contrario, en Fuenlabrada, una población urbana del primer mundo, la mayoría de la población es inmunocompetente y no está desnutrida, como refleja un peso medio de 77kg en nuestros pacientes con afectación visceral, mayor incluso en sub-saharianos, 79kg. Ya hemos comentado las razones de que haya más adultos que niños en nuestra serie, relacionada con la pirámide de edad y la falta de exposición previa en un contexto de brote epidémico (51). Por otro lado, la cobertura sanitaria universal y la cercanía de la población al hospital hace muy accesible el sistema sanitario a toda la población, lo que condiciona una menor mortalidad, como luego veremos, pero también un perfil diferente de población inmunodeprimida susceptible. Por un lado, la cohorte VIH residente de Fuenlabrada está mayoritariamente tratada y con carga viral indetectable (55). Y, por otro lado, el auge de las terapias biológicas y el extendido sistema de trasplantes de nuestro país condiciona un creciente número de enfermos inmunosuprimidos que no existe en otras regiones del mundo con peor status sanitarios, pero que presenta un escenario de investigación muy interesante (27)(86).

#### **Cuadro clínico de leishmaniasis visceral típica**

Respecto al cuadro clínico, hay que destacar que la fiebre, la esplenomegalia y la pancitopenia estuvieron presentes en más del 90% de los pacientes inmunocompetentes con LV de nuestra serie. Esto concuerda con lo descrito en la literatura y son los síntomas definidos por la OMS para sospechar una leishmaniasis visceral (3), por lo que a priori cabe pensar que la leishmaniasis tiene un cuadro clásico de presentación fácil de identificar. Sin embargo, debemos puntualizar algunas cuestiones. Aunque la fiebre en la LV clásicamente se considera una fiebre intermedia

sin focalidad, en nuestra serie y en la práctica clínica habitual un importante número de pacientes han referido síntomas focalizadores en la anamnesis dirigida, destacando la cefalea (38%), que fue significativamente más frecuente en pacientes inmunocompetentes, la tos (32%) o los síntomas digestivos (22%). Teniendo en cuenta que la esplenomegalia y la trombopenia en el contexto de síntomas focalizadores inespecíficos pueden ser fácilmente confundidas con un cuadro viral o, en el caso de pacientes sub-saharianos, con malaria, nuestra experiencia es que en un entorno clínico de baja sospecha el diagnóstico se retrasa, como demuestra que en los primeros años del brote nuestra mediana de días de diagnóstico desde el inicio de los síntomas fue de 30 días.

Más del 90% de los pacientes inmunocompetentes presentaron elevación de reactantes de fase, en el caso de la PCR con mayor frecuencia que los pacientes inmunodeprimidos, con significación estadística. En general, hemos observado que la clínica de los pacientes inmunocompetentes ha tendido a ser más virulenta que la de los inmunodeprimidos: menos fiebre y reactantes de fase aguda en los pacientes inmunodeprimidos, fundamentalmente a costa de los pacientes VIH, y menos esplenomegalia a causa de los pacientes en tratamiento inmunosupresor. Resultados similares ya habían sido descritos en pacientes trasplantados y en VIH (13) y en pacientes con enfermedades autoinmunes (87). Una explicación razonable es que la propia clínica de la LV se produce en gran medida como resultado de una importante estimulación inmunológica, especialmente humoral, por lo que se puede deducir que una alteración de la misma puede llevar a una sintomatología menos llamativa. Por otro lado, la pancitopenia sí estuvo casi siempre presente entre los pacientes

inmunodeprimidos, incluso se observó más que en los inmunocompetentes, aunque sin diferencias significativas.

Debemos recalcar que la presencia de adenopatías en el contexto de LV típica por *L. infantum* es poco frecuente en la literatura, salvo en los casos en que coexisten con otras enfermedades o en pacientes muy inmunodeprimidos, como pueden ser los coinfectados por VIH(36)(37). En algunas series de LV en Sudán del Sur (17) y Etiopía (38)(39), sí se han descrito adenopatías de forma más frecuente, aunque la especie causante de LV es diferente (*L. donovani*), como desarrollaremos más adelante en el apartado de leishmaniasis ganglionar (LLL). En nuestra serie solo hemos visto tres casos con criterios de LV que además presentaban adenopatías. Los tres pacientes estaban inmunosuprimidos, 2 de ellos VIH, y en los dos casos en los que se hizo PAAF de las adenopatías no se encontraron parásitos de *Leishmania*. A diferencia de los pacientes con LLL, estos tres casos tenían criterios de LV (fiebre, esplenomegalia, pancitopenia, elevación de reactantes de fase) y eran inmunosuprimidos. En un contexto de leishmaniasis por *L. infantum*, es importante diferenciar los pacientes LV con adenopatías de los pacientes con LLL, por sus implicaciones terapéuticas y pronósticas.

### **Síndrome hemofagocítico**

Una de las características más destacadas que hemos observado entre nuestros pacientes es el elevado número de ellos que cumplieron criterios de síndrome hemofagocítico (o de linfohistiocitosis hemofagocítica, HLH en sus siglas en inglés). Como ya se ha comentado, el HLH es un síndrome clínico poco frecuente pero muy grave provocado por la activación descontrolada de linfocitos T, células NK y

macrófagos que a su vez producen una reacción inflamatoria exagerada mediada por la hiperproducción de citocinas (44). En definitiva, un trastorno inmunitario desencadenado por un determinado antígeno que produce una respuesta inmune muy importante pero ineficaz, y que suele ser fatal en un gran porcentaje de pacientes, sobre todo cuando se relacionan con trastornos genéticos (más frecuentes en niños) o con procesos hematológicos y oncológicos. En los últimos años está cobrando cada vez mayor importancia dada su asociación con enfermedades infecciosas potencialmente tratables, y entre ellas una de las más frecuentes es la leishmaniasis visceral.

En nuestra serie hasta 42 pacientes (casi el 40% de los pacientes con LV típica) cumplían criterios de HLH, lo que en sí mismo ya es un número de pacientes muy elevado teniendo en cuenta la escasa frecuencia con la que se reporta este síndrome. Incluso es probable que el número sea incluso mayor. Por un lado, de los 8 criterios a valorar según las guías clínicas (47), hubo dos que no pudimos comprobar en ningún paciente al no disponer en el hospital de las técnicas de determinación tanto del CD25 soluble, como para comprobar la disminución o ausencia de actividad de las células NK. Además, en 18 pacientes (16.4% del total de LV) no pudimos recoger datos de al menos un criterio más, en 5 de los cuales faltaba más de uno. Teniendo en cuenta que se necesitan cumplir al menos 5 criterios para confirmar el síndrome hemofagocítico, es más que probable que si se hubiera contado con todos los datos el número de afectados habría sido bastante mayor.

Dicho esto, y bajo estas limitaciones, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de pacientes con diagnóstico de síndrome hemofagocítico en función del estatus inmunológico, y aunque vimos una tendencia ( $p=0.131$ ) a menor incidencia de este síndrome en pacientes de raza negra

(28%) frente al resto (47%), las limitaciones ya comentadas no permiten llegar a ninguna conclusión definitiva, ya que un 38% de los pacientes de raza negra cumplían al menos 4 criterios.

No obstante, y al hilo de la probable susceptibilidad genética de ciertos pacientes aparentemente inmunocompetentes a padecer LV, se ha investigado la asociación de diferentes polimorfismos genéticos con el riesgo de leishmaniasis visceral, con resultados contradictorios. Un estudio en Sudán encontró una posible asociación con el gen NRAMP1 (88), mientras otros estudios en el área mediterránea (89) y en Brasil (90) no encontraron susceptibilidad a LV en diferentes loci del complejo mayor de histocompatibilidad II y III. Sin embargo, sí se ha demostrado la existencia de una susceptibilidad genética a padecer HLH, muy relacionada como hemos visto con la LV. En una cohorte americana de 50 pacientes con HLH, se encontraron diferentes mutaciones en el gen PRF1 que condicionaban una menor actividad de las células NK (77), mutación genética que se encontró como ya hemos comentado con mayor frecuencia en afroamericanos. Y se ha descrito un caso familiar de mutación genética del gen UNC13D en una forma infantil de HLH que debuta como leishmaniasis visceral, reflejando una posible susceptibilidad genética a ambas enfermedades (91).

Para ilustrar la escasa frecuencia con la que se diagnostica el HLH en nuestro entorno podemos valorar el estudio de Hernández-Jiménez et al (92). En él se hace una recopilación de todos los pacientes adultos diagnosticados de HLH durante el periodo 2010-2015 en el Hospital 12 de Octubre de Madrid, un complejo hospitalario de más de 1300 camas, y el de referencia para el Hospital de Fuenlabrada en varias especialidades, como por ejemplo la Unidad de Trasplantes. En dicho periodo se diagnosticaron únicamente 18 pacientes que cumplían los criterios de HLH, de los

cuales en 15 pacientes se logró hallar la etiología: 8 tuvieron una causa oncológica (7 de ellos linfomas), 6 causa infecciosa (4 de ellos por una leishmaniasis visceral, el resto por virus VEB y CMV) y 1 inflamatoria. En 3 pacientes no se llegó a determinar la causa del HLH y la mortalidad global fue del 44%. Llama la atención que durante los diferentes estudios diagnósticos solo se realizó serología de *Leishmania* al 66% de los pacientes afectados, y ello a pesar de encontrarse dentro del periodo de brote epidémico, y que como hemos comentado el Hospital 12 de Octubre es el hospital terciario de referencia en el área afectada por el mismo. Con los datos de nuestra serie, reforzamos las conclusiones del propio estudio de Hernández-Jiménez, en el que recomiendan descartar *Leishmania* ante cualquier paciente con sospecha de síndrome hemofagocítico. Teniendo en cuenta la mortalidad del cuadro y que podemos estar hablando de una enfermedad tratable y curable, nos parece no ya recomendable sino claramente obligada la búsqueda activa de *Leishmania* por diferentes técnicas diagnósticas (y no solo la serología, que podría dar falsos negativos) en cualquier región donde la leishmaniasis sea endémica (y con mayor motivo si se produce en un contexto de brote epidémico).

Resultados y conclusiones similares también se alcanzan en el estudio de Blázquez-Gamero et al (75), donde se reporta la serie de pacientes pediátricos con LV (desde el inicio del brote hasta el 31 de diciembre de 2012) y su relación con el síndrome hemofagocítico. En él, de los 24 niños atendidos, 10 cumplieron criterios de HLH, un porcentaje similar al de nuestra serie en adultos, pudiendo además determinar el CD25 soluble en algunos pacientes. En su caso hasta 2 pacientes llegaron a iniciar tratamiento específico para el HLH (con Etopósido, Ciclosporina A y dexametasona) antes del diagnóstico de LV. Posteriormente todos los pacientes

recibieron tratamiento con Anfotericina B liposomal con buena evolución de todos ellos, lo que refuerza la necesidad de sospechar la leishmaniasis para así acelerar el diagnóstico ante cualquier paciente con síndrome hemofagocítico.

En el mismo estudio también se señala, como ya se ha comentado, el gran número de pacientes de etnia africana que presentaron una LV (46%, todos nacidos en España), sin encontrar diferencias significativas entre los que cumplieron criterios de HLH y los que no. De la misma forma que en nuestra serie, el porcentaje de afectados con síndrome hemofagocítico fue mayor entre los pacientes de otras etnias diferentes a la africana, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

En resumen, en nuestra experiencia y de acuerdo con la literatura previa, debemos destacar primero que, aunque no aparece presente en todas las listas de etiología del HLH (47), se debe incluir la leishmaniasis visceral en el diagnóstico diferencial del síndrome hemofagocítico (91)(93). Y en segundo lugar que, en el contexto de una LV y un HLH, debe primarse el tratamiento de la LV, que en la mayoría de los casos resuelve con éxito el HLH sin necesidad de terapias inmunosupresoras (75)(93). Es más, al término de esta obra, se ha publicado recientemente un documento de consenso sobre el manejo del HLH en los adultos, donde ya se recogen algunas de estas recomendaciones (94).

Finalmente, es de especial interés la elevación de la ferritina por varios motivos. Por un lado, el alto porcentaje de pacientes inmunocompetentes con LV con ferritina elevada, 97%, de tal forma que en el contexto de sospecha clínica de LV, una ferritina normal sugiere que debemos pensar en otro diagnóstico. Por otro lado, por la elevada cifra de ferritina que suelen alcanzar (más del 76% con ferritina superiores a

1000 mcg/L, con una mediana de 6000 mcg/L), que estrecha el diagnóstico diferencial ya que son pocas las enfermedades que causan cifras tan elevadas de ferritina. Y finalmente, por tratarse de una prueba de fácil determinación en cualquier laboratorio, disponible en el día de la realización, de gran utilidad. Apenas en casos aislados se ha reportado esta asociación (95)(96), que podría tener relación con la estimulación del sistema THelper2 característica de la LV, que produce una importante elevación de reactantes de fase aguda y, en cierto modo, relacionada con los mecanismos que ponen en marcha el HLH. También es conocido que *Leishmania infantum* precisa de hierro para su metabolismo (97), aunque no se conoce si esto puede tener relación con la ferritina. En cualquier caso, nos parece de gran interés para la práctica clínica diaria.

### **Autoinmunidad y otras serologías**

Al estudiar la positividad de los auto-anticuerpos y de otras serologías infecciosas en el contexto de LV, pretendemos resaltar de nuevo la dificultad del diagnóstico sin una alta sospecha clínica, ya que estos falsos positivos cruzados pueden confundir el diagnóstico. Los hallazgos clínicos habituales de la LV, especialmente la fiebre y las citopenias también pueden presentarse en muchas enfermedades autoinmunes o infecciosas, y puede ser fácil errar en el diagnóstico, sobre todo tratándose de pacientes inmunocompetentes, que a priori no son un factor de riesgo de LV como sí se puede pensar de los inmunodeprimidos.

En nuestra serie, hasta el 70% de los pacientes presentaron hipergammaglobulinemia y el 30% ANA positivos, y por otro lado 4 de 14 pacientes con falsos positivos de serología para *Leishmania* en los que no se confirmó el

diagnóstico de LV presentaban una enfermedad autoinmune de base. Santana et al (87) revisan el diagnóstico diferencial de LV con lupus eritematoso sistémico (LES), a raíz de una serie de 3 casos y una posterior revisión de la literatura. Encuentran por un lado 10 casos de pacientes con LES ya conocido, que presentan una LV que se confunde inicialmente con un brote de LES. De ellos, 4 pacientes presentaban afectación renal glomerular. Este hecho también ha sido descrito en el contexto de nuestro brote, donde 4 pacientes del área del Hospital Severo Ochoa de Leganés con LV debutaron como glomerulonefritis (98). De los pacientes revisados por Santana et al, todos presentaron fiebre, 7 tuvieron esplenomegalia, 9 presentaron pancitopenia y todos, elevación de reactantes. Por el contrario, sólo 2 de los 7 casos en los que se midió tenían el complemento bajo, lo que puede servir de ayuda para diferenciar ambas entidades.

Por otro lado, Santana et al (87) también encontraron otros 18 casos de LV que fueron inicialmente diagnosticados de forma errónea como LES. En el 90% de ellos de nuevo los pacientes presentaban fiebre, esplenomegalia, pancitopenia y elevación de reactantes, es decir, la clínica típica de LV. Solo uno de los pacientes debutó con artritis, pero tenían autoanticuerpos positivos en su mayoría, motivo que llevó al diagnóstico erróneo de LES: ANAs en el 94% de los pacientes, factor reumatoide en el 55%, Coombs directo 50%, anticuerpos antimúsculo liso 33%, anti-dsDNA 16%, anticoagulante lúpico 11%, y en al menos un paciente se encontró positividad para anti-CCP, anti-Sm, anti-cardiolipina IgM, a-ANCA, c-ANCA, anti-mitocondriales y antitiroideos. Estos pacientes fueron tratados de su LV sin que se describiera en los casos reportados evidencia posterior de enfermedad autoinmune de base. Hay que reseñar que esta falsa positividad de los autoanticuerpos en relación con la LV no se ha

observado de la misma manera en el contexto de la leishmaniasis cutánea (99). Por otra parte, y para dificultar aún más el diagnóstico diferencial, se ha descrito que estos autoanticuerpos pueden presentar reacción cruzada con proteína histona de *Leishmania* (100), de tal manera que pacientes con enfermedad autoinmune de fondo sin LV pueden dar positivo en la serología ELISA de *Leishmania*, como pudo ocurrir en cuatro de nuestros pacientes con falso positivo en la serología.

Es evidente que sin la sospecha clínica que implique solicitar un estudio específico de leishmaniasis (serología, aspirado de médula ósea) estos pacientes habrían sido erróneamente diagnosticados. Esto cobra mayor importancia si consideramos que el tratamiento de un brote de LES, que es inmunosupresor, no hará sino empeorar la leishmaniasis.

De la misma manera, más del 43% de los pacientes diagnosticados de LV presentaron otras serologías positivas durante el estudio diagnóstico, especialmente llamativas en nuestro laboratorio hasta 11 y 10 serologías positivas de *Borrelia burgdorferi* y *Coxiella burnetti* respectivamente, lo que en un contexto de diagnóstico diferencial de fiebre de origen desconocido también dificulta el diagnóstico. Y, como también ocurría con la autoinmunidad, 2 pacientes con diagnóstico de fiebre Q presentaron falsos positivos para serología de *Leishmania*. Es conocida desde prácticamente el inicio del desarrollo de las serologías de *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi* la reacción cruzada entre ellas, ambas enfermedades coexistentes en algunas zonas de Sudamérica y ambos parásitos muy próximos filogenéticamente (101)(102), que se ha conseguido mejorar en la actualidad (103). También se han encontrado reacciones cruzadas con *Toxoplasma* y *Mycobacterium* (104)(105). No hemos

encontrado literatura sobre la asociación de LV con falsas serologías positivas a infecciones bacterianas, como *Borrelia* o *Coxiella*.

Estos hallazgos no son sorprendentes al estudiar la fisiopatología de la LV. Se conoce que el fracaso de la inmunidad celular, mediada por los linfocitos T-Helper1, en contener los parásitos de *Leishmania* en el punto de entrada, en la piel o las adenopatías locales, conlleva la llegada de estos a órganos profundos, especialmente bazo y médula ósea. Allí pueden proliferar sin apenas oposición, desencadenando y estimulando así la inmunidad humoral mediada por linfocitos T-Helper2, cuyo objetivo fundamental es la activación de linfocitos B a células plasmáticas y la producción de anticuerpos, mediada principalmente por IL-10. La continua proliferación de *Leishmania* en bazo y médula ósea por una respuesta celular inadecuada, promueve una escalada continua de activación de la vía T-Helper 2 que es ineficaz para contener los parásitos pero es la causa de la fiebre, la importante elevación de reactantes de fase y la masiva producción de anticuerpos. Estos anticuerpos pueden ser específicos frente a *Leishmania*, pero también inespecíficos, lo que explica la producción indiscriminada de autoanticuerpos y de otros anticuerpos frente a diferentes microorganismos infecciosos (20)(106). Por ello es preciso conocerlos y tenerlos en cuenta a la hora del diagnóstico diferencial si no queremos acabar errando ya que, como hemos visto, pueden aparecer falsos positivos de otras enfermedades en pacientes con LV, y falsos positivos de *Leishmania* en pacientes con otras enfermedades.

## Diagnóstico

Incluso en países desarrollados, las técnicas diagnósticas clásicas, incluyendo aspirado de médula ósea y serología frente a anticuerpos totales ELISA/IFI, suelen llevar una demora de varios días, por ser en unos casos invasivas, laboriosas, o no estar disponibles en algunos centros. Así, nuestra mediana de días desde el inicio de los síntomas al diagnóstico era de 30 en los primeros meses del brote, en los que no disponíamos de serologías en nuestro centro. Por este motivo se decidió en nuestro hospital y en el contexto del brote epidémico, introducir una serología rápida (dipstick) basada en el antígeno rK39, que ha resultado de gran utilidad, acelerando el proceso diagnóstico (se trata de un sencillo y barato test que permite conocer el resultado en 15 minutos) en los casos de sospecha clínica, y ha permitido bajar a 17 días desde inicio de síntomas hasta el diagnóstico. No se debe confundir esta técnica con la antigenuria Katex, que se ha desechado para diagnóstico de LV por sus pobres resultados (3). Como toda serología, lo que detectamos son anticuerpos del paciente, en este caso frente a antígeno rK39, no medimos el antígeno directamente. Este antígeno rK39 está presente en las kinesinas de *Leishmania* del complejo *L. donovani*, que incluye *L. donovani donovani* y *L. infantum*, mientras que la serología convencional detecta anticuerpos frente a antígenos totales de *Leishmania*. Y como todas las técnicas de detección de anticuerpos, se puede medir por diferentes métodos, por ejemplo por ELISA (107), aunque la técnica empleada en nuestro centro es un dipstick (tira de papel) inmunocromatográfico que presenta la ventaja de su sencillez y rapidez (rK39-ICT). A priori, esta serología debería ser más específica que las convencionales (ELISA/IFI), ya que el antígeno rK39 es la diana de anticuerpos específicos de *L. chagasi* (*infantum*) mientras que la serología convencional detecta anticuerpos frente a

antígenos totales de *Leishmania*, y se considera que su positividad se relaciona con LV activa (104).

Este test rápido rK39-ICT se ha convertido en una alternativa de gran utilidad en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral en el terreno, donde otras aproximaciones no están disponibles, pero sus resultados han arrojado datos contradictorios según las series, probablemente en relación con el diferente contexto en que se utilice (104)(107)(108). Su uso en brotes epidémicos o zonas endémicas, como screening indiscriminado en el contexto de fiebre o más específico, y su uso con diferentes especies de *Leishmania* en diferentes poblaciones étnicas, probablemente condiciona los resultados. Este test parece muy fiable en el Subcontinente Indio (105) y en Sudamérica (107), con una sensibilidad y especificidad en general por encima del 90%; pero su sensibilidad y especificidad en el este de África se ha mostrado muy inferior (109). Esta diferencia parece explicada por la diferencia en la secuencia entre los homólogos rK39 en las cepas de *L. donovani* del este de África y del Subcontinente Indio. Si bien este último muestra una gran similitud con el homólogo de *L. infantum* (de donde procede el antígeno recombinante empleado en el rK39-ICT), el primero muestra menor similitud de secuencia con las consecuentes limitaciones para la unión de los anticuerpos contra este antígeno (108). Además, se ha sugerido que el test dipstick tendría peor sensibilidad que el uso de rK39 con ELISA (104), aunque otros en cambio han obtenido similares resultados (107). Una explicación de estas diferencias de sensibilidad puede deberse a la diferencia en los niveles de anticuerpos IgG anti-leishmania que se generan, que parecen claramente mayores en la población india (110).

En definitiva, existía cierta incertidumbre previa al uso de esta técnica en nuestro medio, *L. infantum* en el área mediterránea, y en un brote epidémico. Nuestra experiencia en pacientes inmunocompetentes con LV es que esta técnica rápida ha sido positiva en el 44% de los casos, es decir, una sensibilidad baja comparada con la descrita para *L. infantum*(107). Sin embargo, solo uno de los pacientes dio falso positivo, lo que da una especificidad del 99%. Es decir, un resultado negativo no descarta leishmaniasis visceral, mientras un resultado positivo, que por otro lado ocurre en casi la mitad de los casos, prácticamente confirma el diagnóstico. Esta información es de extrema utilidad, y nos permite plantear que en casos de pacientes graves con rK39-ICT positivo es factible iniciar el tratamiento inmediatamente después de recoger el resto de muestras necesarias para confirmar posteriormente el diagnóstico.

Respecto a la serología convencional, la sensibilidad en inmunocompetentes es del 95%, similar a lo descrito y lo esperable(3)(104)(107). Por el contrario, hubo hasta 11 individuos inmunocompetentes cuyo resultado se consideró falso positivo, con una especificidad por debajo del 90% (88%), posiblemente en el contexto de una exposición muy alta en la población que condiciona positividad de la serología en pacientes sin LV. En este escenario, un ELISA negativo nos debería hacer pensar en otro diagnóstico. Por tanto, la combinación de ambas serologías, una muy específica (rK39-ICT) y otra muy sensible (ELISA) nos permite acotar el diagnóstico a la espera de las pruebas confirmatorias.

El método clásico de diagnóstico ha sido la demostración del parásito en los órganos profundos, el más extendido la visualización del mismo en la médula ósea al

microscopio óptico, donde se pueden localizar macrófagos llenos de amastigotes (Figura 22).

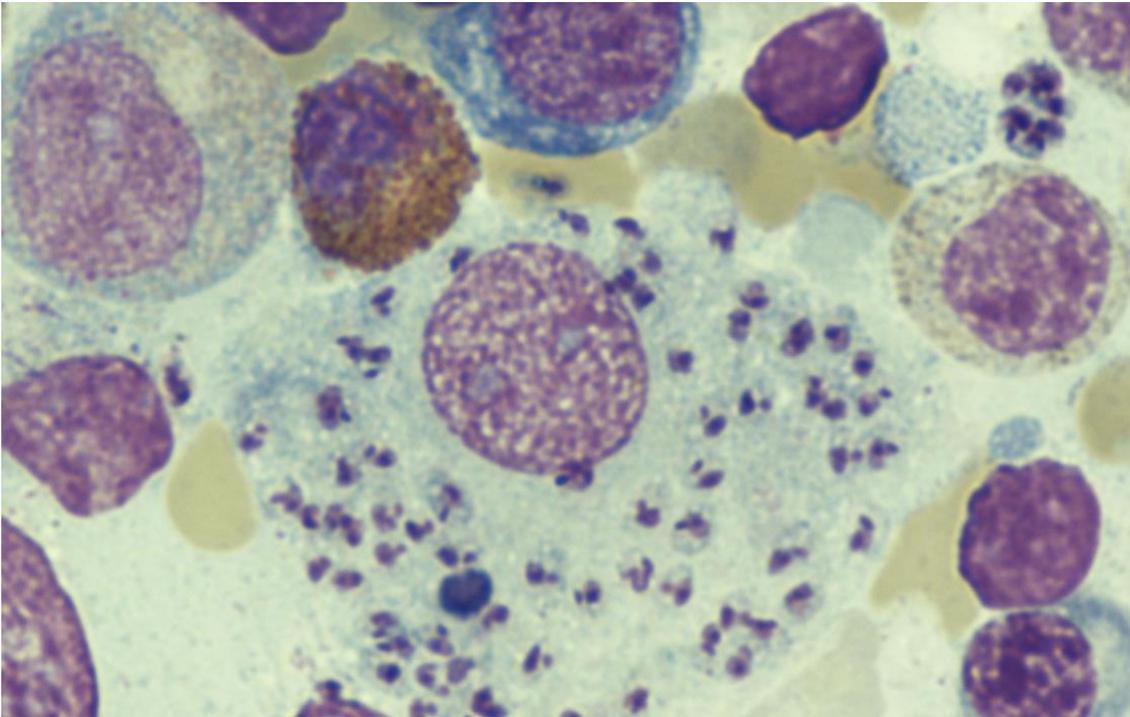


Fig. 22. Amastigotes de *Leishmania* en el interior de un macrófago, en un aspirado de médula ósea de uno de nuestros pacientes (cortesía Dr. Alfredo Bermejo).

Se ha descrito una sensibilidad con esta prueba de entre un 60-85% (104). Sin embargo, nuestros resultados han sido descorazonadores, ya que apenas se encontraron parásitos de *Leishmania* en un 40% de pacientes inmunocompetentes, claramente insuficiente y por debajo de lo esperado. Esto puede deberse al propio hecho de ser inmunocompetentes, en quienes lo esperable es que haya menos parásitos que en pacientes inmunodeprimidos (13). Sin embargo en nuestra serie tampoco estos obtuvieron un resultado significativamente mejor, apenas un 50%. Hay que destacar que la técnica empleada también es importante, dado que se ha comprobado que la sensibilidad de la prueba aumenta cuanto mayor es el tiempo de lectura y son examinados mayor número de campos al microscopio (111). La gran

ventaja de la microscopía óptica es su rapidez, ya que puede confirmar el diagnóstico de forma definitiva el mismo día en que se obtiene la muestra.

El cultivo de *Leishmania* no se considera útil para la práctica rutinaria (104), por su laboriosidad y sobre todo el retraso, ya que los parásitos suelen tardar entre 1 y 4 semanas en crecer. No obstante, sigue siendo extremadamente útil para obtener parásitos vivos, esenciales en estudios de sensibilidad y tipaje de especie. Está descrito, como ocurrió en nuestro caso, que el cultivo sea más rentable en pacientes inmunodeprimidos, de nuevo en relación con una mayor carga parasitaria (13).

Recientemente, se considera la detección de DNA de *Leishmania* por PCR, en sangre o en aspirado de médula ósea, como el gold standard para el diagnóstico de LV(3)(49)(104). Respecto a la detección en sangre periférica, los resultados de sensibilidad y especificidad son muy variables, de nuevo en función del contexto y el área geográfica, variando entre el 70% (112) y el 97%(59)(113) en sangre, que llegan al 100% en m. ósea (59)(113), aunque ha sido mayoritariamente testado en pacientes VIH. Nuestros resultados en inmunocompetentes son algo inferiores, con un 87% en sangre periférica y un 91% en médula ósea. La PCR de *Leishmania* en sangre periférica es una prueba que se empezó a utilizar en el hospital en el año 2013, por lo que nuestra muestra es más pequeña. En cualquier caso, ambas pruebas son claramente superiores al resto en cuanto a su rentabilidad diagnóstica.

En base a estos resultados, y dada la gravedad de esta enfermedad mortal sin tratamiento, creemos que en nuestro medio el diagnóstico de LV en inmunocompetentes debe basarse en una combinación de varios test. Nuestra propuesta de diagnóstico para leishmaniasis visceral en pacientes inmunocompetentes se basaría en una serología rápida (rK39-ICT) como test de screening, disponible

incluso desde Urgencias, y una serología convencional que puede ser útil para descartar el diagnóstico. En una zona de alta endemia como la nuestra, estos resultados deben confirmarse con PCR en sangre y PCR en aspirado de médula ósea, tal como proponemos en la Figura 25.

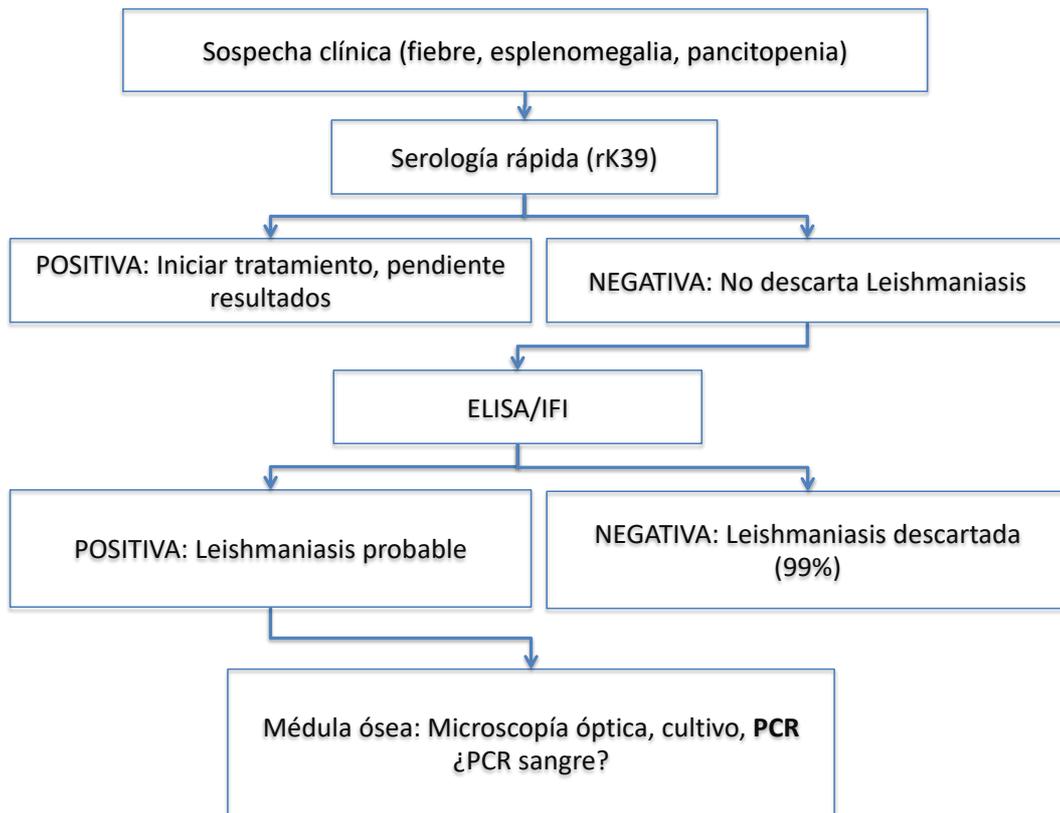


Fig. 23. Propuesta de algoritmo diagnóstico de LV en paciente inmunocompetente basada en la experiencia durante el brote epidémico de Fuenlabrada.

### Tratamiento y evolución

Respecto al tratamiento, hay que hacer constar en primer lugar que las recomendaciones para el tratamiento de la LV por *L. infantum* en pacientes inmunocompetentes del área mediterránea se basan en estudios realizados principalmente en niños (62)(64)(84)(114)(115), siendo de elección los complejos de anfotericina B entre 18 y 21 mg/kg de dosis total, con diferentes esquemas de

tratamiento (dos dosis en días consecutivos, dosis en 6 días o en 7 días) como reflejan también las guías clínicas de la OMS (3)(49)(116). Con estas pautas, las tasas de recidiva y mortalidad en inmunocompetentes de nuestro medio con anfotericina B liposomal son inferiores al 5% (62)(64)(114). No obstante, con dosis inferiores, como 15 mg/kg, se puede curar definitivamente al 90% de los pacientes (64), habiéndose objetivado una mayor probabilidad de curación a mayor dosis usada. En otras áreas geográficas, donde la especie responsable de LV es *L. donovani*, la respuesta es diferente. En el subcontinente indio las dosis precisas para obtener similares tasas de curación son menores, siendo suficiente una dosis única de 10 mg/kg dosis total (117), mientras que en el este de África la respuesta a anfotericina B liposomal es inferior a la pauta de elección en esta zona que es la combinación de antimoniales y paramomicina, aunque la alta prevalencia de co-infección por VIH dificulta la interpretación de estos resultados (118).

En nuestra serie, todos los pacientes inmunocompetentes presentaron muy buena respuesta inicial al tratamiento ya que se consideraron clínicamente curados a final de tratamiento según la definición propuesta por la OMS (3)(49), independientemente de la dosis recibida (que fue al menos de 15 mg/Kg), que era lo esperable. Sin embargo, el porcentaje de recidivas en inmunocompetentes fue claramente superior al esperado, cercano al 10%. Muy interesante es que 6 de los 7 pacientes que recidivaron recibieron dosis consideradas adecuadas según las guías de tratamiento de la LV en inmunocompetentes, es decir al menos 18mg/kg dosis total. Con esta dosis, los resultados previamente descritos de recidivas están por debajo del 3% en inmunocompetentes (64), aunque en nuestra serie el porcentaje de recidivas de los pacientes que recibieron dosis menores de 21 mg/Kg (entre 15-18 mg/Kg) fue

superior al 50%, por únicamente el 4.5% de recidivas en pacientes con un tratamiento mínimo de 21 mg/Kg. Esta alta tasa de recidivas podría explicarse por una cierta susceptibilidad de los pacientes, uno de ellos tenía 95 años de edad, y 5 pacientes eran de etnia negra, lo que nos deja de nuevo la duda respecto a los posibles factores intrínsecos predisponentes en este grupo étnico. De hecho, más del 70% de los pacientes que recidivaron eran de raza negra (independientemente del lugar de nacimiento) aunque, a pesar de que la tasa de recidiva en este grupo fue casi el doble que en los pacientes de otras etnias (12% vs 6.5%), la diferencia no resultó estadísticamente significativa. De hecho, tras analizar distintos factores de forma independiente, el único factor de riesgo que hemos encontrado en nuestra serie para predecir una recidiva fue el tratamiento incorrecto según estas guías clínicas.

Por otro lado, tampoco podemos descartar un mayor grado de virulencia de la cepa del brote como causa de estos resultados. De hecho, esta cepa se ha mostrado diferente a la descrita en ningún otro lugar del mundo hasta ahora (52), siendo una cepa adaptada a la fiebre (53) y de la que estudios preliminares sugieren una mayor virulencia que la cepa predominante en España hasta ahora (119).

En cualquier caso, y en vista de nuestros resultados, en nuestro medio no recomendamos usar dosis inferiores a 21 mg/kg en inmunocompetentes, y en pacientes de etnia negra se podrían plantear dosis incluso algo superiores.

Posteriormente todos los pacientes que recidivaron fueron tratados de nuevo con diferentes pautas, desde 21 a 40 mg/Kg, siendo todas eficaces y sin haberse producido nuevas recaídas.

A falta de una prueba que confirme la curación definitiva de la enfermedad, se considera como paciente definitivamente curado el que no presenta síntomas al cabo

de 6 meses tras el fin de tratamiento (3). Sin embargo, en uno de los pacientes inmunocompetentes que recidivó (y un inmunodeprimido), la recaída se produjo pasado ese tiempo, a los 9 meses. En nuestra experiencia el seguimiento de estos pacientes tras el tratamiento debe extenderse al año, como sugieren las recomendaciones más recientes, basadas en parte en nuestra experiencia (49).

Hemos descrito la reinfección de una mujer sub-sahariana que, tras resolverse su LV, volvió a presentar una leishmaniasis cutánea un año después. La coexistencia de ambas formas de presentación es excepcional y solo se ha descrito en pacientes muy inmunodeprimidos (120)(121). Esto se debe a que los mecanismos inmunológicos que permiten o impiden que se produzca una u otra forma clínica, aunque aún no del todo conocidos, sí son claramente diferentes. Como ya hemos comentado, en un caso la respuesta inmune es capaz de controlar la infección en el mismo punto de inoculación (LC), y en el otro es incapaz de controlarla y la infección se disemina por todo el organismo (LV). Siendo así, parece evidente que para que se produzca una LC después de haber sufrido una LV, esta nueva forma de presentación tiene que deberse a una nueva picadura, que ahora se produce en un organismo que ha aprendido a combatir la infección. Quizá por ello, no hemos encontrado en la literatura descrita la presencia de LC y LV de forma consecutiva en un mismo paciente.

Respecto a la mortalidad global de la serie, solo tres pacientes han fallecido, los tres inmunodeprimidos, aunque dos de ellos presentaban una cirrosis en situación de pre-trasplante y su causa fundamental de muerte se consideró la hepatopatía crónica. En nuestra experiencia, la evolución de los pacientes cirróticos ha dependido más de su situación basal en relación con su enfermedad de base que de la propia LV. Un paciente falleció sin llegar a recibir tratamiento y otro paciente, que se curó y recidivó

posteriormente, también falleció por complicaciones de su cirrosis. Los pacientes oncológicos, por el contrario, presentaron todos buena evolución, independientemente de la dosis de tratamiento empleada, sin recidivas.

En general en nuestra serie los tratamientos con anfotericina B han sido bien tolerados. Hay que tener en cuenta que entre las razones de su progresiva introducción como fármaco de primera línea en los países desarrollados a pesar de su elevado precio, sustituyendo a otros fármacos eficaces como los antimoniales, se encuentra la mala tolerancia de estos, con moderados a graves efectos secundarios que en algunos casos han sido fatales (114)(122). Aun así, la anfotericina B liposomal no está exenta de efectos adversos, y entre los más habituales en nuestro caso se han observado el deterioro de la función renal, de forma frecuente y reversible tras la finalización del tratamiento, y la tiritona, sin observarse diferencias en función del estatus inmune. Por tanto, y ante la presencia de insuficiencia renal, se puede optar por continuar el tratamiento sin modificar la dosis diaria o espaciar el mismo sin ser necesario suspenderlo, ya que en todos los casos la afectación renal es reversible.

Respecto a sus distintas formulaciones, nuestra experiencia con la anfotericina B liposomal, además de extensa (dado que la mayoría de los pacientes se han tratado con este fármaco), ha sido más satisfactoria que con la anfotericina B complejo lipídico. Aunque fueron pocos los pacientes tratados con ABCL, sí presentaron más efectos secundarios de forma estadísticamente significativa, y también se produjeron más recidivas (incluyendo también al único paciente de nuestra serie considerado fracaso a final de tratamiento) que con ABL. Estos hallazgos son congruentes con lo reportado previamente (123).

### **Leishmaniasis visceral. Comparación con casos anteriores al brote**

Aunque es complicado extraer muchas conclusiones dado el escaso número de pacientes que habían sido atendidos antes del inicio del brote epidémico, sí nos permite realizar algunas consideraciones que nos parecen interesantes.

Lo más destacable son las diferencias en el perfil epidemiológico, que ya hemos discutido previamente en anteriores apartados. El predominio de pacientes inmunosuprimidos VIH condiciona el resto de hallazgos y pensamos que explica las otras dos claras diferencias que hemos encontrado: Por un lado por los niveles más bajos de PCR, que ya hemos comentado también que durante el brote fueron menores en los pacientes inmunodeprimidos fundamentalmente a costa de los VIH, y por otro por el menor número de pacientes que cumplían criterios de síndrome hemofagocítico, probablemente porque uno de los criterios como es la fiebre no estuvo tan presente (como también hemos comentado que ocurría entre los pacientes VIH del brote).

De la misma manera que hemos destacado el elevado número de pacientes inmigrantes y de etnia africana afectados durante el brote epidémico, comprobamos que es una tendencia que ya se observaba en los casos anteriores al mismo, aunque de forma menos llamativa dado el pequeño tamaño muestral de los afectados. De nuevo esto refuerza la necesidad de entender los mecanismos que predisponen a enfermar con una determinada forma de presentación. Por nuestra parte sí que estos datos nos están influyendo a la hora de elevar la sospecha diagnóstica en pacientes de raza negra, ya sean nativos españoles o extranjeros, aunque estos provengan de países donde la leishmaniasis no sea endémica (o precisamente por ello como se ha comentado).

Como es esperable, a medida que han ido apareciendo más casos de LV se han ido reduciendo los tiempos hasta el diagnóstico definitivo, principalmente porque la sospecha diagnóstica de leishmaniasis ante un paciente que consulta por fiebre y pancitopenia ha pasado de ser una etiología infrecuente dentro de un amplio abanico de diagnósticos diferenciales, a la primera causa a descartar en nuestro entorno. A esta mejora también ha contribuido de forma evidente el mayor acceso a diferentes técnicas diagnósticas como el test rápido rk39-ICT, que ya ha sido comentado, que no se empezó a utilizar en nuestro hospital hasta bien comenzado el brote, y que ha acelerado tanto el diagnóstico como el tratamiento precoz en los casos graves. Tampoco la PCR en sangre estuvo disponible en la época anterior al brote y, aunque en menor medida dada su reciente incorporación, también ha venido a facilitar el diagnóstico y a mejorar la seguridad en la confirmación de los casos.

En cuanto al tratamiento de los pacientes, comprobamos que en los casos anteriores se cumplieron patrones similares a los que hemos observado, a mayor escala, durante el brote epidémico. Esto es, en general buena respuesta a final de tratamiento de todos los pacientes, con recidivas que se produjeron posteriormente, en los pacientes VIH que abandonaron la profilaxis o no recuperaron niveles de CD4, y en un paciente inmunocompetente que se había tratado con dosis de 15mg/Kg de ABCL.

## LEISHMANIASIS GANGLIONAR

Uno de los aspectos más llamativos y a la vez novedosos de este brote epidémico ha sido el gran número de pacientes, todos ellos inmunocompetentes, que se han visto afectados con una forma de presentación muy poco conocida por *L. infantum*, la leishmaniasis ganglionar (o leishmanial localized lymphadenopathy, LLL), que sí estaba descrita para otras especies de *Leishmania* pero ninguna de ellas causante de LV, como *L. braziliensis*, *L. tropica* o *L. major*(35)(40)(42)(124). De hecho es la mayor serie de casos de LLL por *L. infantum* descrita hasta la fecha y que hemos publicado cuando aún solo habíamos recogido 17 casos (125). Previamente tan solo había casos aislados descritos en Europa, en algunos de ellos sin identificar siquiera la especie causal (41)(126)(127)(128)(129)(130)(131)(132) y uno posterior a nuestra serie (133).

La particularidad de *L. infantum* de producir tanto leishmaniasis visceral y leishmaniasis cutánea en pacientes inmunocompetentes, y la conocida presencia de adenopatías en el contexto de leishmaniasis visceral por *L. donovani* (17), nos planteó la duda razonable de cómo distinguir la forma visceral con adenopatías de la forma ganglionar localizada. Hemos comprobado cómo las características clínicas, el perfil diagnóstico y la evolución de los pacientes con LLL se han diferenciado claramente de las observadas en los pacientes con LV típica, por lo que nos parece claro que hay que considerarla una entidad aparte, por otro lado, fácilmente reconocible. A continuación, discutiremos de forma más detallada estas diferencias.

### Características epidemiológicas

En primer lugar, el clásico predominio entre el sexo masculino descrito habitualmente en la LV, que también hemos observado en nuestra serie, no se ha visto reflejado en los pacientes con LLL, en los que el porcentaje entre sexos ha sido más equilibrado, como ocurre en la LC (68). En los casos previamente descritos de forma aislada, se han visto afectados tanto hombres como mujeres sin que se haya podido observar ninguna tendencia, salvo en la serie iraní por *L. tropica* donde predominan los varones (42).

Respecto a la edad de los pacientes no ha habido diferencias con la LV típica en cuanto a la edad media pero, como dijimos entonces, el pico de edad de la forma ganglionar (LLL) está entre los 50 y los 60 años, como ocurre con la LC (68), en posible relación con cierto grado de inmunidad previa en la población de más edad que evita la progresión a la forma visceral. Los casos de Oriente Medio, por el contrario, suelen ocurrir en niños menores de 12 años (42), mientras que los pocos casos reportados por *L. infantum* se han descrito en pacientes de entre 25 y 60 años (41)(126)(127)(128)(129)(130)(131)(132)(133). No tenemos constancia de que en nuestro brote se haya diagnosticado a ningún niño de LLL.

También hemos comentado previamente la gran cantidad de pacientes de raza negra y/o de origen subsahariano afectados de LV típica, mientras que en la LLL, al igual que en la LC (68), el porcentaje de pacientes de etnia africana es muy pequeño, destacando cómo este hecho va en contra de un factor de exposición y a favor de mecanismos genéticos intrínsecos en esta etnia.

Respecto al estatus inmunológico, todos los pacientes con LLL sin excepción fueron inmunocompetentes. En general los casos descritos previamente en la

literatura nos hablan de pacientes aparentemente sanos, aunque García-González et al describen dos casos de una mujer esplenectomizada por anemia hemolítica, y otro paciente con antecedente de un Linfoma de Hodgkin, aunque en remisión completa (130).

Por tanto, el perfil epidemiológico de los pacientes LLL es totalmente superponible a los pacientes con LC, y completamente diferente al de la LV. No hay un predominio por sexos, el pico de edad ocurre en la década de los 50 años, aunque todas las edades son afectadas, el perfil étnico es similar al de la población y los pacientes son inmunocompetentes. Aunque desconocemos los mecanismos exactos por los que se produce la LLL, parece evidente que se necesita un sistema inmunológico que produzca una respuesta celular adecuada mediada por los linfocitos T que permita controlar la infección en los ganglios sin que llegue a diseminarse por el organismo, de forma similar a como se produce en la LC (106).

### **Cuadro clínico**

Aquí sí podemos resaltar cómo en todos y cada uno de los parámetros clínicos se observaron diferencias significativas entre la LV y la LLL. El cuadro clínico de la LLL se puede resumir en adenopatías de larga evolución (media de 3 meses), sin fiebre ni otra sintomatología sistémica. Al menos en nuestra serie ningún paciente refirió molestias a ningún nivel que no fueran las estrictamente relacionadas a nivel local con la adenopatía o adenopatías concretas (y ya hemos comentado que en nuestra serie de LV típica se observó un llamativo y heterogéneo grupo de síntomas focalizadores a varios niveles entre los motivos de consulta de los pacientes). De forma similar a nuestra serie, en los casos descritos con anterioridad se detalla un cuadro de

adenopatía/s sin fiebre en todos los pacientes, en general sin especificar otros síntomas, salvo en un caso al menos donde el paciente refería un cuadro de astenia intensa acompañando a la adenopatía, en este caso cervical (133).

Respecto al número y localización de las adenopatías hay cierta heterogeneidad entre los pacientes de nuestra serie, de la misma manera que en los casos previos. Se puede tratar de una adenopatía aislada o de varias y, aunque la localización en el territorio cervical y alrededores es claramente la más frecuente (en cualquiera de sus formas: laterocervical, submandibular, parotídeo, pre y retroauricular), pueden aparecer en cualquier otro territorio (en nuestro caso supraclavicular, axilar e inguinal). Esta distribución de las lesiones podría ser esperable si asumimos que la adenopatía es una respuesta inmunológica del organismo como contención del parásito tras la picadura del mosquito, y esta se va a producir generalmente en áreas expuestas (y cabeza y cuello parecen las zonas más razonables). El hecho de que en nuestra serie más del 25% de los casos presentaran de forma concomitante una lesión cutánea sospechosa en una zona próxima a la adenopatía apoya esta teoría. Y a su vez nos debe llamar la atención el hecho de que aparezcan adenopatías en diferentes territorios ganglionares, algo infrecuente en nuestra serie, con lo que se podría sospechar una suerte de diseminación de la enfermedad, como comentaremos a continuación. En los casos previos también se observa un predominio por la afectación de un territorio único, más frecuentemente cervical (128)(131)(132)(133), aunque también se ha descrito algún caso de afectación de varios territorios ganglionares (129).

En cuanto a la esplenomegalia y pancitopenia clásicas de la LV, únicamente una paciente con LLL presentó ambas en el estudio diagnóstico. Esta paciente, como ya se

comentó en el apartado de Resultados, fue la única que posteriormente no respondió adecuadamente al tratamiento, progresando en la evolución con aparición de nuevas adenopatías en diferentes territorios ganglionares. Una segunda paciente de nuestra serie presentó anemia y leucopenia, pero sin esplenomegalia ni otras alteraciones. El resto de pacientes de nuestra serie de LLL no presentaron ninguna alteración analítica, ni siquiera elevación de reactantes de fase aguda, de la misma manera que en los casos descritos hasta ahora, y con gran diferencia respecto a la LV típica. Valorando posteriormente las características y la evolución de esta primera paciente, consideramos que podría haberse tratado de una LV atípica que debutó como adenopatía ganglionar aislada. Las alteraciones analíticas y la presencia de esplenomegalia sugieren que dicha paciente es la única que realmente tenía afectación visceral. Hay que destacar entre sus antecedentes que presentaba un Síndrome de Noonan, un trastorno genético por alteración del cromosoma 12, que afecta a varios sistemas y característicamente produce alteraciones en el desarrollo cardíaco y musculoesquelético. En este caso, aunque a priori el síndrome no tiene descritas alteraciones en la inmunidad celular, tampoco podemos descartar que esta condición hubiera influido en la evolución.

Debemos destacar que no es descartable que alguno de estos pacientes pueda tener parásitos de *Leishmania* en órganos profundos. Se han encontrado especies que no producen afectación visceral, como *L. tropica*, en bazo (124). Se ha descrito persistencia de los parásitos en diferentes órganos de pacientes clínicamente curados tras el tratamiento (134)(135), y se conoce que hay pacientes inmunocompetentes asintomáticos con PCR positiva para *Leishmania* (136). En todos estos casos, salvo inmunodepresión, estos pacientes nunca desarrollarán clínica. No hay garantía, por

tanto, de que ningún tratamiento pueda eliminar todos los parásitos de *Leishmania* de un paciente, y la experiencia no ha mostrado beneficio clínico alguno de tratar pacientes asintomáticos. Por ello las recomendaciones de tratamiento de LV exigen que los pacientes cumplan síntomas de LV (3). En ninguno de nuestros pacientes realizamos aspirado de médula ósea para excluir la presencia de LV, así como en la mayoría de los casos descritos en la literatura, aunque aquellos casos de LLL por *L. infantum* donde se realizó aspirado de médula ósea no se encontró *Leishmania* (126)(133).

Como hemos visto, en nuestra serie la coexistencia de adenopatías y LV fue infrecuente, solo ocurrió en 3 casos, y todos ellos eran pacientes inmunodeprimidos (dos pacientes VIH y uno en tratamiento inmunosupresor). En dos de ellos se vieron afectados diferentes territorios ganglionares y en ninguno se demostró *Leishmania* en la PAAF del ganglio. La presencia de adenopatías es frecuente en la leishmaniasis diagnosticada en Sudán del Sur, donde la especie endémica es *L. donovani* y se ha descrito hasta un 84% de pacientes con adenopatías (17), pero en este caso los pacientes se presentaron con fiebre en todos los casos, esplenomegalia en 96% y con pancitopenia en la mayoría, un perfil clínico claramente diferente al de la LLL.

### **Diagnóstico**

A la hora de realizar el diagnóstico, hemos comprobado que las técnicas clásicas utilizadas para la LV no son ni tan rentables, ni prácticamente necesarias en muchos casos, para el diagnóstico de la LLL. El diagnóstico en este caso se basa en la PAAF de las adenopatías, en la que mayoritariamente se observa una linfadenitis granulomatosa no necrotizante (aunque en algunas ocasiones puede ser necrotizante),

y se confirma al objetivarse los parásitos de *Leishmania*, o cuerpos de Leishman-Donovan. En nuestra serie ocurrió así en prácticamente todos los casos, aunque en dos no se llegaron a visualizar los parásitos y fue necesario recurrir a otras técnicas como la PCR y la serología. Esto es importante en cuanto a que la linfadenitis granulomatosa es un hallazgo que se puede encontrar en multitud de enfermedades diferentes, tanto infecciosas como no infecciosas (137), por lo que ante un paciente que se presenta con adenopatía única o múltiple, sin fiebre ni otra clínica sistémica, puede ser difícil de diagnosticar en un contexto de baja sospecha clínica de leishmaniasis, fundamentalmente si no se objetivan los cuerpos de Leishman-Donovan.

Dado el escaso número de pacientes descritos en la literatura con LLL por *L.infantum* no hay estudios anatomopatológicos con los que podamos comparar la frecuencia de los hallazgos citológicos de nuestra serie. En general en los casos referidos con anterioridad, dado que la primera sospecha clínica a descartar era de síndrome linfoproliferativo, habitualmente se ha biopsiado la adenopatía afectada, y el diagnóstico se ha realizado en todos los casos tras objetivar los cuerpos de Leishman-Donovan (41)(126)(127)(128)(129)(130)(131)(132)(133). Por tanto, no es descartable que haya habido más pacientes en los que no se hayan observado los parásitos, y por tanto no hayan podido ser diagnosticados, por la falta de sospecha clínica. De hecho, esta misma revisión de Asano (2012) sobre la linfadenitis granulomatosa (137) ni siquiera incluye la leishmaniasis dentro del amplio diagnóstico diferencial. En cualquier caso, la evolución benigna de la enfermedad tranquiliza en cuanto a los diagnósticos perdidos.

Un tipo similar de linfadenitis por *Leishmania* sí que ha sido ampliamente estudiada en una serie de pacientes iraníes con una presentación similar a la LLL por

*L.infantum*, en este caso por *L.tropica* 42), una especie solo relacionada hasta entonces con la leishmaniasis cutánea. En su serie de 70 adenopatías biopsiadas dividieron los hallazgos en 5 grupos de linfadenitis en función de las características citológicas observadas: inflamación aguda con células gigantes, granulomas histiocíticos, granulomas epitelioides, tipo células plasmáticas y tipo histioplasmocítico mixto, aunque siempre siendo necesaria la demostración de los cuerpos de Leishman-Donovan para confirmar el diagnóstico. En una revisión más reciente de 170 casos de linfadenitis por *L.tropica* (43), hasta en 50 casos no se observaron los parásitos, concluyendo que se deben valorar ciertos hallazgos citológicos sugerentes de la infección por *Leishmania*, en los casos en los que no existan los cuerpos de L-D, o sean tan escasos que pasen desapercibidos.

No hay que olvidar, en cualquier caso, que estas series se refieren exclusivamente a *L. tropica* que, a diferencia de *L.infantum*, no produce leishmaniasis visceral, por lo que no sabemos si estos resultados son extrapolables a nuestra serie de LLL.

En nuestra serie, de los dos casos en los que no se vieron parásitos en la PAAF, uno se resolvió solo sin tratamiento, y el otro con dosis bajas del mismo. Habría que valorar si el hecho de no visualizarse parásitos puede implicar buen pronóstico, por encontrarse en fase de resolución, aunque harían falta bastantes más casos para poder afirmarlo. Hubo un caso en el que sí se vieron los cuerpos de L-D y que no se llegó a tratar; posteriormente se realizó de nuevo una biopsia para descartar otras patologías y ya no se volvieron a visualizar los parásitos, lo que podría apoyar esa teoría, aunque el paciente tenía una linfadenitis granulomatosa necrotizante, característica de infección por micobacterias. Hay que destacar que en este paciente se habría

planteado el diagnóstico y probablemente tratamiento de tuberculosis en caso de no tener PAAF previa con visualización de *Leishmania*.

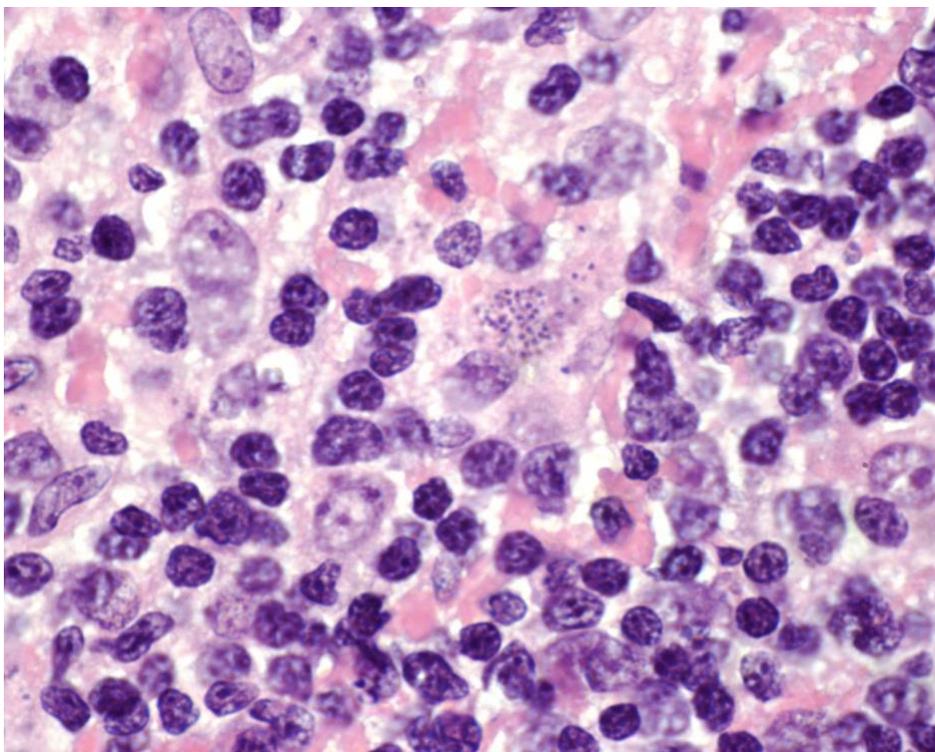
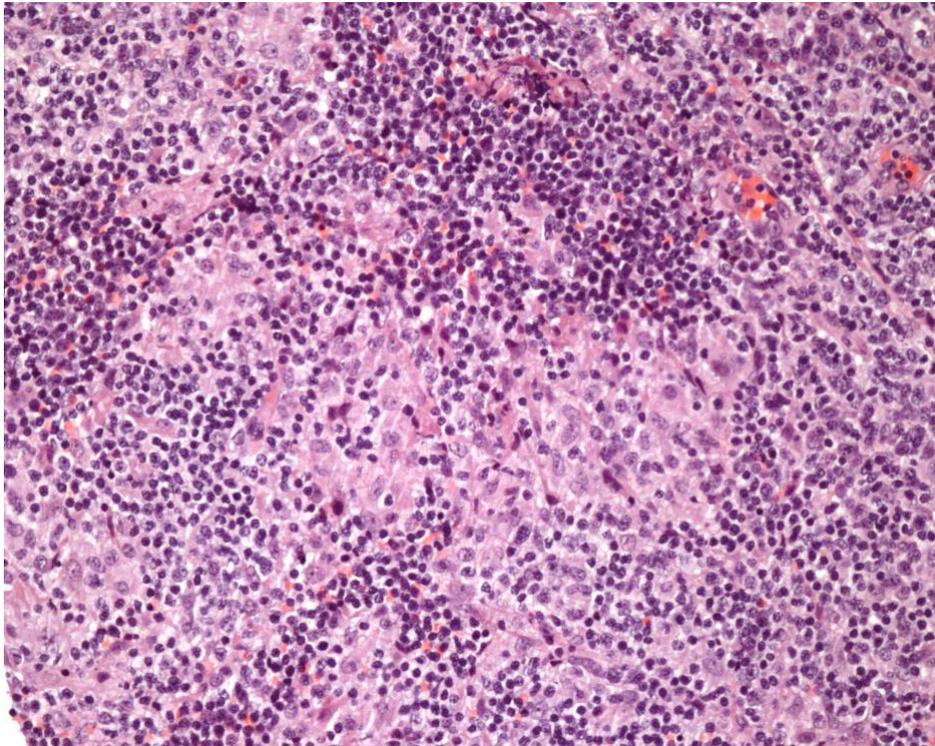


Fig. 26. Linfadenitis granulomatosa no necrotizante (A), con parásitos de *L.infantum* (B) en uno de nuestros pacientes con LLL (cortesía Dr. Juan Carlos Tardío).

Aparte de la PAAF, la PCR de *Leishmania* en ganglio parece ser la prueba más rentable en la LLL, mostrando una sensibilidad del 100% tanto en nuestra serie como en los casos descritos previamente. Por tanto, debería plantearse en todos los pacientes con sospecha clínica en los que no se hayan objetivado los parásitos en la PAAF. La serología, por el contrario, no parece tan rentable como en la LV, al igual que el test rápido rk39-ICT, y la PCR en sangre, en caso de que fuera positiva (algo que no ocurrió en los 3 pacientes en los que se utilizó). Este dato apoya de nuevo el comportamiento inmunológico de la LLL, más cercano a la LC, donde la ausencia de activación de la inmunidad celular THelper 2 evita la síntesis y liberación de anticuerpos específicos para *Leishmania* (106).

Por tanto, en cuanto a la sospecha clínica, la LLL debería formar parte del diagnóstico diferencial de cualquier paciente con adenopatías a estudio que viva o haya estado de paso en zonas endémicas, especialmente si el hallazgo histológico muestra granulomas.

### **Tratamiento y evolución**

Evaluar la curación clínica a final de tratamiento de LLL es complicado, ya que al final del mismo las adenopatías no habían desaparecido en casi ningún caso. Consideramos respuesta a tratamiento la no aparición de nuevas adenopatías y la ausencia de síntomas sistémicos. Con estos criterios, respondieron al tratamiento todos los pacientes salvo la paciente ya descrita con síndrome de Noonan.

Sin embargo, a diferencia de la LV, en el caso de la LLL no ha habido ninguna recidiva posterior tras más de 5 años de seguimiento de la cohorte, independientemente de las dosis de tratamiento empleadas, y utilizando dosis

menores a las recomendadas por las guías clínicas para LV en el área mediterránea. Aquí hay que recordar que no existe aún una pauta concreta recomendada para la LLL por *L. infantum*. Dado que solo se habían descrito casos aislados de LLL, hasta ahora se había considerado una forma atípica de LV, por lo que las dosis empleadas han sido las recomendadas para LV por *L. infantum* y siempre con buena evolución (41)(126)(127)(128)(129)(130)(131)(132)(133). En nuestra serie incluso algunos pacientes han presentado resolución espontánea, aunque lenta, sin ningún tratamiento, evolución que está bien documentada en el caso de LLL por *L. tropica* (42).

La única excepción fue la paciente que ya ha sido comentada, que se consideró fracaso a final de tratamiento por progresión de las adenopatías y que precisamente había sido tratada con dosis de las consideradas adecuadas para LV típica (21mg/Kg de anfotericina B liposomal). Tras retratamiento con 40mg/Kg se resolvió definitivamente el cuadro.

En general el tratamiento con anfotericina B liposomal fue peor tolerado por los pacientes con LLL, a pesar de su mejor evolución, que por los pacientes con LV, de forma estadísticamente significativa.

### **Respuesta celular en LLL**

Debemos destacar los resultados de los estudios inmunológicos realizados a los pacientes con LLL, que nunca se han realizado hasta la fecha. Nuestro grupo ya ha demostrado la utilidad de estos test como predictores de buena evolución clínica de los pacientes con LV tras tratamiento en diferentes escenarios (27)(30), siendo reflejo de una adecuada respuesta inmune celular frente a *Leishmania*. No es sorprendente

que, de acuerdo a la buena evolución de los pacientes con LLL, con curación espontánea en algunos casos y sin evolución a forma visceral, los pacientes con LLL antes de tratamiento tengan un perfil inmunológico similar a los pacientes con LV tras tratamiento (resultados no mostrados) y similares a LLL tras tratamiento. Si esta herramienta puede ser útil para decidir los pacientes susceptibles de tratarse o no podría investigarse en futuros estudios.

En definitiva, todo ello nos hace replantearnos la necesidad de tratamiento de esta entidad que, como hemos comprobado, se diferencia claramente de la LV en casi todos los aspectos estudiados. Al no poder identificar en este momento los casos de resolución espontánea, a nuestro juicio, está justificado el tratamiento sistémico de la LLL, aunque consideramos que se pueden utilizar dosis menores a las actualmente recomendadas para LV en el área mediterránea.

En nuestra experiencia la dosis de anfotericina B liposomal de 10 mg/kg dosis total ha funcionado bien, y se podría usar en nuestra opinión siempre que el paciente cumpla criterios de LLL: adenopatías sin fiebre, esplenomegalia, pancitopenia o elevación de reactantes de fase aguda.

## **Limitaciones de nuestro trabajo**

Las limitaciones de nuestros resultados incluyen la incapacidad para extrapolar conclusiones con respecto a los pacientes receptores de trasplante de órganos y los niños con LV, dado que ya hemos explicado las razones por las que no han sido incluidos. Independientemente no consideramos que este hecho afecte a los resultados del estudio ya que se trata de pacientes con peculiaridades diferentes a las de los pacientes estudiados por nosotros.

Además, nuestros resultados tienen limitaciones inherentes a los estudios observacionales, que no permiten establecer conclusiones definitivas sobre los regímenes de diagnóstico y tratamiento debido a la necesidad de ensayos clínicos comparativos aleatorizados. Como es comprensible, la prioridad en el contexto de este brote inesperado fue el tratamiento de los pacientes y no permitió el diseño de un ensayo doble ciego adecuado.



# CONCLUSIONES



1. En regiones endémicas, se debe estar vigilante ante la posibilidad de una leishmaniasis visceral, no solo en pacientes inmunodeprimidos como es habitual, sino también en inmunocompetentes.
2. Entre las personas inmunocompetentes, los varones tienen mayor riesgo que las mujeres de padecer una leishmaniasis visceral.
3. Existe una sospecha razonable para considerar que los pacientes de raza negra y/o de origen subsahariano poseen unas condiciones intrínsecas que les hacen más susceptibles a presentar una leishmaniasis visceral en caso de infección por *Leishmania*.
4. Ante cualquier paciente diagnosticado de síndrome hemofagocítico o HLH es obligado descartar leishmaniasis de forma activa, cuanto menos con pruebas tanto serológicas como parasitológicas.
5. Los pacientes inmunocompetentes presentan la clínica típica de LV (fiebre, pancitopenia, esplenomegalia, y elevación de reactantes de fase aguda) con mayor frecuencia que los inmunodeprimidos, lo que debería orientar mejor al diagnóstico. La presencia de autoanticuerpos o de otras serologías positivas en estos pacientes no debe hacer pensar en un diagnóstico alternativo hasta haber descartado completamente la leishmaniasis como etiología.
6. El test rK-39-ICT, a pesar de su menor sensibilidad respecto a lo publicado en otra series, se ha mostrado útil en el contexto de un brote epidémico por *L. infantum*, para realizar el diagnóstico de forma rápida y poder iniciar el

tratamiento de los casos graves. Combinado con la serología convencional permite a su vez descartar el diagnóstico en el 99% de los casos.

7. Los regímenes de tratamiento recomendados en las guías de la OMS para LV por *L. infantum* en el área mediterránea han funcionado en general bien, excepto por una tasa inesperadamente alta de recidivas en los pacientes inmunocompetentes tratados con 18 mg/Kg de ABL dosis total. En nuestro medio no recomendamos utilizar menos de 21mg/Kg, y se podrían valorar incluso dosis mayores si se trata de pacientes de etnia subsahariana.
8. El seguimiento de los pacientes inmunocompetentes con LV debería ser de al menos un año tras el tratamiento para confirmar la ausencia de recidivas.
9. Hemos diagnosticado un importante número de casos de LLL, todos ellos en pacientes inmunocompetentes, siendo la mayor serie de LLL por *L. infantum* descrita hasta la fecha.
10. La definición de LLL por *L. infantum* sería: adenopatía/s como única forma de presentación, sin repercusión sistémica ni analítica y con reactantes de fase aguda normales, en paciente inmunocompetente.
11. El diagnóstico de LLL se realiza por PAAF del ganglio afectado. El hallazgo más frecuente es la linfadenitis granulomatosa pudiendo o no objetivarse los parásitos de *Leishmania*. En los casos en que no se visualice el parásito el diagnóstico se confirma por PCR en el propio ganglio. Las serologías en sangre no son rentables.
12. En nuestra experiencia los pacientes que cumplen criterios de LLL por *L. infantum* pueden tratarse con dosis más bajas de las recomendadas para la LV del área mediterránea. En nuestra experiencia la dosis de anfotericina B

liposomal a dosis de 10 mg/kg dosis total sería suficiente. En casos seleccionados se podría hacer observación clínica sin tratamiento.

13. Se debe incluir la leishmaniasis en el diagnóstico diferencial de cualquier adenopatía aislada a estudio en áreas endémicas.
14. Por sus características clínicas y evolutivas claramente diferenciadas, la LLL debería plantearse como una entidad diferente a medio camino entre la LV y la LC, y no como una mera presentación atípica de las anteriores.



# BIBLIOGRAFÍA

1. Leishman WB. ON THE POSSIBILITY OF THE OCCURRENCE OF TRYPANOSOMIASIS IN INDIA. *Br Med J.* 1903 May 30;1(2213):1252–4.
2. Ross R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. *Br Med J.* 1903 Nov 28;2(2239):1401.
3. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Geneva: World Health Organization; 2010. 186 p. (WHO technical report series).
4. Cazorla-Perfetti D. LISTa comentada de LOS FLEBOTOMINOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE) citados para VENEZUELA. *Saber.* 2015;27(2):178–231.
5. González U, Pinart M, Sinclair D, Firooz A, Enk C, Vélez ID, et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Aug 5;(8):1–101.
6. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009 Dec;136(14):1915–34.
7. *Leishmaniasis\_worldwide\_epidemiological\_and\_drug\_access\_update.pdf* [Internet]. [cited 2018 Nov 9]. Available from: [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis\\_worldwide\\_epidemiological\\_and\\_drug\\_access\\_update.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf)
8. Harms G, Schönian G, Feldmeier H. Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jul;9(7):872–5.
9. Custodio E, Gadisa E, Sordo L, Cruz I, Moreno J, Nieto J, et al. Factors Associated with Leishmania Asymptomatic Infection: Results from a Cross-Sectional Survey in Highland Northern Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 Sep 27;6(9):e1813.
10. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006 Dec;22(12):552–7.
11. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10

- years. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(2):298–319.
12. 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;21(2):334–59, table of contents.
  13. Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(3):191–199.
  14. Zanger P, Kötter I, Kremsner PG, Gabrysch S. Tumor necrosis factor alpha antagonist drugs and leishmaniasis in Europe. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Jul;18(7):670–6.
  15. Guarneri C, Bevelacqua V, Patterson JW, Tchernev G. Cutaneous and visceral leishmaniasis during anti-TNF $\alpha$  therapy. *Wien Med Wochenschr* 1946. 2017 Mar;167(3–4):78–82.
  16. Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore).* 2001 Jan;80(1):54–73.
  17. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar in displaced people from southern Sudan: epidemiological, clinical and therapeutic findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991 Jun;85(3):365–9.
  18. 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;69(8):4709–18.
  19. Carrillo E, Jimenez MA, Sanchez C, Cunha J, Martins CM, da Paixão Sevá A, et al. Protein Malnutrition Impairs the Immune Response and Influences the Severity of Infection in a Hamster Model of Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Feb 25 [cited 2018 Nov 9];9(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934886/>
  20. Oghumu S, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2010 Nov;126(3):389–96.
  21. Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* 2005;75–

- 76:115–30.
22. Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007 Sep;28(9):378–84.
  23. van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Apr;20(4):286–99.
  24. Rijal S, Ostyn B, Uranw S, Rai K, Bhattarai NR, Dorlo TPC, et al. Increasing Failure of Miltefosine in the Treatment of Kala-azar in Nepal and the Potential Role of Parasite Drug Resistance, Reinfection, or Noncompliance. *Clin Infect Dis.* 2013 Jun 1;56(11):1530–8.
  25. Kemp M, Kurtzhals JA, Kharazmi A, Theander TG. Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections. *Immunol Cell Biol.* 1993 Dec;71 ( Pt 6):583–7.
  26. Singh OP, Sundar S. Whole blood assay and visceral leishmaniasis: Challenges and promises. *Immunobiology.* 2014 Apr;219(4):323–8.
  27. Carrillo E, Carrasco-Antón N, López-Medrano F, Salto E, Fernández L, San Martín JV, et al. Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to *Leishmania*, and for Confirming Cure from Leishmaniasis, in Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):e0004179.
  28. Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Nov;71(5):561–7.
  29. Kumar R, Singh N, Gautam S, Singh OP, Gidwani K, Rai M, et al. *Leishmania* specific CD4 T cells release IFN $\gamma$  that limits parasite replication in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Oct;8(10):e3198.
  30. Castro A, Carrillo E, San Martín JV, Botana L, Molina L, Matía B, et al. Lymphoproliferative response after stimulation with soluble leishmania antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients. *Acta Trop.* 2016 Dec;164:345–51.
  31. Cillari E, Vitale G, Arcoledo F, D'Agostino P, Mocciaro C, Gambino G, et al. In vivo and in vitro cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients

- with active visceral leishmaniasis. *Cytokine*. 1995 Oct;7(7):740–5.
32. Adem E, Tajebe F, Getahun M, Kiflie A, Diro E, Hailu A, et al. Successful Treatment of Human Visceral Leishmaniasis Restores Antigen-Specific IFN- $\gamma$ , but not IL-10 Production. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Mar;10(3):e0004468.
  33. Ibarra-Meneses AV, Ghosh P, Hossain F, Chowdhury R, Mondal D, Alvar J, et al. IFN- $\gamma$ , IL-2, IP-10, and MIG as Biomarkers of Exposure to *Leishmania* spp., and of Cure in Human Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:200.
  34. Harms G, Fraga F, Batroff B, Oliveira F, Feldmeier H. Cutaneous leishmaniasis associated with extensive lymphadenopathy during an epidemic in Ceará State, northeast Brazil. *Acta Trop*. 2005 Mar;93(3):303–10.
  35. Sousa A de Q, Parise ME, Pompeu MM, Coehlo Filho JM, Vasconcelos IA, Lima JW, et al. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1995 Oct;53(4):380–5.
  36. Jarvis JN, Lockwood DN. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection: *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Feb;26(1):1–9.
  37. Russo R, Laguna F, López-Vélez R, Medrano FJ, Rosenthal E, Cacopardo B, et al. Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003 Oct 2;97(sup1):99–105.
  38. Leta S, Dao THT, Mesele F, Alemayehu G. Visceral Leishmaniasis in Ethiopia: An Evolving Disease. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Sep 4 [cited 2018 Nov 1];8(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4154678/>
  39. Hurissa Z, Gebre-Silassie S, Hailu W, Tefera T, Laloo DG, Cuevas LE, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of patients with visceral leishmaniasis and HIV co-infection in northwest Ethiopia. *Trop Med Int Health TM IH*. 2010 Jul;15(7):848–55.
  40. Gaafar A, Ismail A, el Kadar AY, Hashim E, Khalil EA, el Hassan AM. Necrotizing and suppurative lymphadenitis in *Leishmania major* infections. *Trop Med Int Health TM IH*. 1996 Apr;1(2):243–50.
  41. Ignatius R, Loddenkemper C, Woitzik J, Schneider T, Harms G. Localized Leishmanial Lymphadenopathy: An Unusual Manifestation of Leishmaniasis in a

- Traveler in Southern Europe. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2011 Aug;11(8):1213–5.
42. Kumar PV, Moosavi A, Karimi M, Safaei A, Noorani H, Abdollahi B, et al. Subclassification of localized *Leishmania* lymphadenitis in fine needle aspiration smears. *Acta Cytol.* 2001 Aug;45(4):547–54.
  43. Daneshbod Y, Daneshbod K, Khademi B, Negahban S, Bedayat G-R. New cytologic clues in localized *Leishmania* lymphadenitis. *Acta Cytol.* 2007 Oct;51(5):699–710.
  44. Janka GE, Lehmborg K. Hemophagocytic syndromes — An update. *Blood Rev.* 2014 Jul;28(4):135–42.
  45. Scott RB, Robb-Smith AHT. Histiocytic medullary reticulosis. *Lancet.* 1939;234:194–198
  46. Risdall RJ, McKenna RW, Nesbit ME, Krivit W, Balfour HH Jr, Simmons RL et al. Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. *Cancer* 1979, Sep; 44(3);993.1002
  47. Henter J-I, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Feb;48(2):124–31.
  48. Sotoca-Fernández JV, García-Villaescusa L, Lillo-Lillo M, García-Mialdea O, Carrascosa-Romero C, Tebar-Gil R. Síndrome hemofagocítico secundario a leishmaniasis visceral *An Pediatr (Barc).* 2008;69(1):46-8
  49. L. Gradoni, R. López-Vélez, M. Mokni, Publication date: 5 July 2017, Languages: English, ISBN: 978 92 89052 51 1, WHO reference number: WHO | Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region [Internet]. 2017 [citado 22 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/978-92-89052-51-1/en/>
  50. Boletín Epidemiológico septiembre 2010.pdf [Internet]. [cited 2018 Nov 1]. Available from: <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3DSeptiembre2010.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&bl>

- obkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1271951984277&ssbinary=true
51. 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 Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2013;18(30):20546.
  52. 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. *Eurosurveillance.* 2013;18(30):20545.
  53. 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;190(1–2):268–71.
  54. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid publicado sobre Enfermedades de Declaración Obligatoria (Nº 11. Volumen 23. Noviembre 2017) [Internet]. 2017 [citado 16 de diciembre de 2018]. Disponible en: <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM020199.pdf>
  55. Castro Gordon A. Estudio del impacto del brote de leishmaniasis en la cohorte de pacientes VIH del Hospital Universitario de Fuenlabrada. Tesis Doctoral. 2016 [cited 2018 Nov 1]; Available from: <https://eciencia.urjc.es/handle/10115/14420>
  56. Población asignada - Madrid.org - Hospital de Fuenlabrada [Internet]. 2018 [cited 2018 Nov 1]. Available from: [http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1142401923628&language=es&pagename=HospitalFuenlabrada%2FPage%2FHFLA\\_contenidoFinal](http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1142401923628&language=es&pagename=HospitalFuenlabrada%2FPage%2FHFLA_contenidoFinal)
  57. Ayuntamiento de Fuenlabrada / Tu ciudad / Datos generales y estadísticas [Internet]. 2018 [cited 2018 Nov 1]. Available from: <http://www.ayto-fuenlabrada.es/index.do?MP=3&MS=27&MN=2&TR=C&IDR=292>
  58. van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Mar;51(1):133–42.
  59. Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human

- immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 Apr;96 Suppl 1:S185-189.
60. Brote de Leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid [Internet]. Primera. Mayo 2017. Madrid; Available from: <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-Disposition&blobheadervalue1=filename%3DBVCM017962.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1352932004716&ssbinary=true>
  61. Reis LLD, Balieiro AA da S, Fonseca FR, Gonçalves MJF. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017 Oct;50(5):638–45.
  62. Cascio A. A 6 day course of liposomal amphotericin B in the treatment of infantile visceral leishmaniasis: the Italian experience. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jun 16;54(1):217–20.
  63. Sinha PK, van Griensven J, Pandey K, Kumar N, Verma N, Mahajan R, et al. Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients: 2-Year Treatment Outcomes in Bihar, India. *Clin Infect Dis.* 2011 Oct 1;53(7):e91–8.
  64. Davidson RN, Di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Gaeta GB, Pempinello R, et al. Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clin Infect Dis.* 1996;22(6):938–943.
  65. Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR. Sex Hormones and Modulation of Immunity against Leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(2):106–13.
  66. Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S del P. Gender and cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Cad Saúde Pública.* 2001 Feb;17(1):171–80.
  67. Gebremichael Tedla D, Bariagabr FH, Abreha HH. Incidence and Trends of Leishmaniasis and Its Risk Factors in Humera, Western Tigray. *J Parasitol Res.* 2018;2018:8463097.
  68. Aguado M, Espinosa P, Romero-Maté A, Tardío JC, Córdoba S, Borbujo J. Brote de leishmaniasis cutánea en el municipio de Fuenlabrada. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 2013 May;104(4):334–42.

69. Travi BL. Gender Is a Major Determinant of the Clinical Evolution and Immune Response in Hamsters Infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun*. 2002 May 1;70(5):2288–96.
70. Sampaio MJA de Q, Cavalcanti NV, Alves JGB, Fernandes Filho MJC, Correia JB. Risk Factors for Death in Children with Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2010 Nov 2 [cited 2018 Nov 1];4(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2970542/>
71. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Jul;14(3):476–88.
72. Ramos JM, Clavijo A, Moral L, Gavilan C, Salvador T, González de Dios J. Epidemiological and clinical features of visceral leishmaniasis in children in Alicante Province, Spain. *Paediatr Int Child Health*. 2018;38:203–208
73. WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases. WHO | Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. 22 de septiembre de 2017;38(92):557-72.
74. Ibrahim ME, Lambson B, Yousif AO, Deifalla NS, Alnaiem DA, Ismail A, et al. Kala-azar in a high transmission focus: an ethnic and geographic dimension. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Dec;61(6):941–4.
75. Blázquez-Gamero D, Domínguez-Pinilla N, Chicharro C, Negreira S, Galán P, Pérez-Gorricho B, et al. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children with Visceral Leishmaniasis. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(6):667–9.
76. Reich D, Nalls MA, Kao WHL, Akylbekova EL, Tandon A, Patterson N, et al. Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet*. 2009 Jan;5(1):e1000360.
77. Molleran Lee S. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet*. 2004 Feb 1;41(2):137–44.
78. Lima IP, Müller MC, Holanda TA, Harhay M, Costa CHN, Costa DL. Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Apr;46(2):156–60.

79. Xynos ID, Tektonidou MG, Pikazis D, Sipsas NV. Leishmaniasis, autoimmune rheumatic disease, and anti-tumor necrosis factor therapy, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2009 Jun;15(6):956–9.
80. Winthrop KL. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 Nov;2(11):602–10.
81. Kopterides P, Mourtzoukou EG, Skopelitis E, Tsavaris N, Falagas ME. Aspects of the association between leishmaniasis and malignant disorders. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Dec;101(12):1181–9.
82. Pirámides de población del mundo desde 1950 a 2100 [Internet]. PopulationPyramid.net. 2018 [cited 2018 Nov 3]. Available from: <https://www.populationpyramid.net/es/etiopía/2016/>
83. Di Masi F, Ursini T, Iannece MD, Chianura L, Baldasso F, Foti G, et al. Five-year retrospective Italian multicenter study of visceral leishmaniasis treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):414–8.
84. Gradoni L, Soteriadou K, Louzir H, Dakkak A, Toz SO, Jaffe C, et al. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Trop Med Int Health TM IH.* 2008 Oct;13(10):1272–6.
85. Coutinho JVSC, Santos FSD, Ribeiro R do SP, Oliveira IBB, Dantas VB, Santos ABFS, et al. Visceral leishmaniasis and leishmaniasis-HIV coinfection: comparative study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017 Oct;50(5):670–4.
86. Matía Hernando B. Impacto de un brote de leishmaniasis en población inmunosuprimida no VIH. Tesis Doctoral. 2018 [cited 2019 Apr 1]; <https://eciencia.urjc.es/bitstream/handle/10115/16108/TESIS%20DOCTORAL%20Bel%C3%A9n%20Mat%C3%ADa%20Hernando%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
87. Santana IU, Dias B, Nunes EAS, Rocha FAC da, Silva FS, Santiago MB. Visceral leishmaniasis mimicking systemic lupus erythematosus: Case series and a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2015 Jun;44(6):658–65.
88. Bucheton B, Abel L, Kheir MM, Mirgani A, El-Safi SH, Chevillard C, et al. Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. *Genes Immun.* 2003

- Mar;4(2):104–9.
89. Meddeb-Garnaoui A, Gritli S, Garbouj S, Ben Fadhel M, El Kares R, Mansour L, et al. Association analysis of HLA-class II and class III gene polymorphisms in the susceptibility to mediterranean visceral leishmaniasis. *Hum Immunol*. 2001 May;62(5):509–17.
  90. Peacock CS, Sanjeevi CB, Shaw M-A, Collins A, Campbell RD, March R, et al. Genetic analysis of multicase families of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: no major role for class II or class III regions of HLA. *Genes Immun*. 2002 Sep;3(6):350–8.
  91. Balta G, Azik FM, Gurgey A. Defective UNC13D gene-associated familial hemophagocytic lymphohistiocytosis triggered by visceral leishmaniasis: a diagnostic challenge. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014 Jan;36(1):e42-45.
  92. Hernández-Jiménez P, Díaz-Pedroche C, Laureiro J, Madrid O, Martín E, Lumbreras C. Linfocitosis hemofagocítica: análisis de 18 casos. *Med Clínica*. 2016 Dec;147(11):495–8.
  93. Rajagopala S, Dutta U, Chandra KSP, Bhatia P, Varma N, Kochhar R. Visceral leishmaniasis associated hemophagocytic lymphohistiocytosis--case report and systematic review. *J Infect*. 2008 May;56(5):381–8.
  94. La Rosée P, Horne A, Hines M, von Bahr Greenwood T, Machowicz R, Berliner N et al. Recommendations for the management of hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults. *Blood* 2019 Jun 6;133(23):2465-2477. doi: 10.1182/blood.2018894618. Epub 2019 Apr 16.
  95. al-Jurayyan NA, al-Nasser MN, al-Fawaz IM, al Ayed IH, al Herbish AS, al-Mazrou AM, et al. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. *J Trop Pediatr*. 1995;41(3):143–8.
  96. Schulzke I, Mravak S, Weber B. [Kala-azar with marked ferritinemia in a German school child]. *Monatsschrift Kinderheilkd Organ Dtsch Ges Kinderheilkd*. 1987 Oct;135(10):705–7.
  97. Wilson ME, Vorhies RW, Andersen KA, Britigan BE. Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infect Immun*. 1994 Aug;62(8):3262–9.
  98. Ortiz M, Mon C, Herrero JC, Oliet A, Rodríguez I, Ortega O, et al.

- Glomerulonephritis and cryoglobulinemia: first manifestation of visceral leishmaniasis. *Clin Nephrol*. 2015 Jun;83(6):370–7.
99. Horimoto AMC, Costa IP da. Frequency of autoantibodies and serum complement levels in patients with visceral or cutaneous leishmaniasis. *Rev Bras Reumatol*. 2009 Oct;49(5):529–46.
  100. Lakhal S, Benabid M, Sghaier IB, Bettaieb J, Bouratbine A, Galai Y. The sera from adult patients with suggestive signs of autoimmune diseases present antinuclear autoantibodies that cross-react with *Leishmania infantum* conserved proteins: crude *Leishmania* histone and Soluble *Leishmania* antigens [corrected]. *Immunol Res*. 2015 Feb;61(1–2):154–9.
  101. Vexenat A de C, Santana JM, Teixeira AR. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996 Jun;38(3):177–85.
  102. Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg*. 1969 Jul;18(4):500–5.
  103. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, et al. [Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 May;28(5):284–93.
  104. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Sep;9(5):951–8.
  105. Smrkovski LL, Larson CL. Antigenic Cross-Reactivity Between *Mycobacterium bovis* (BCG) and *Leishmania donovani*. *Infect Immun*. 1977 Nov;18(2):561–2.
  106. Wilson ME, Jeronimo SMB, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog*. 2005 Apr;38(4):147–60.
  107. 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.
  108. Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F et al.

- Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2014(6):CD009135), doi: 10.1002/14651858.CD009135.pub2.
109. Kiros YK, Regassa BF. The role of rk39 serologic test in the diagnosis of visceral leishmaniasis in a Tertiary Hospital, Northern Ethiopia. *BMC Res Notes.* 2017 Apr 26;10(1):169.
  110. Bhattacharyya T, Bowes DE, El-Safi S, Sundar S, Falconar AK, Singh OP, et al. (2014) Significantly Lower Anti-*Leishmania* IgG Responses in Sudanese versus Indian Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8(2): e2675. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002675>
  111. Da Silva MR, Stewart JM, Costa CH. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(6), 2005, pp. 811–814
  112. Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1997 Oct;35(10):2454–7.
  113. Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 2000 Jan;38(1):236–40.
  114. Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. Visceral Leishmaniasis Treatment, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2003 Dec;9(12):1617–20.
  115. Syriopoulou V, Daikos GL, Theodoridou M, Pavlopoulou I, Manolaki AG, Sereti E, et al. Two doses of a lipid formulation of amphotericin B for the treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2003;36(5):560–566.
  116. Saravolatz LD, Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, den Boer M, et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2006;43(7):917–924.
  117. Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med.* 2010;362(6):504–512.
  118. Ritmeijer K, ter Horst R, Chane S, Aderie EM, Piening T, Collin SM, et al. Limited

- Effectiveness of High-Dose Liposomal Amphotericin B (AmBisome) for Treatment of Visceral Leishmaniasis in an Ethiopian Population With High HIV Prevalence. *Clin Infect Dis*. 2011 Dec 15;53(12):e152–8.
119. 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;7:499.
  120. Ojeda G, López N, González M, Márquez M. Nódulos cutáneos múltiples, pancitopenia y nódulo pulmonar en un paciente con virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2010 Jun;28(6):389–91.
  121. Blum-Domínguez SDC, Martínez-Vázquez A, Núñez-Oreza LA, Martínez-Hernández F, Villalobos G, Tamay-Segovia P. [Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and visceral leishmaniasis (VL) concurrent with cancer: Presentation of a case]. *Gac Med Mex*. 2017 Feb;153(1):121–4.
  122. Cascio A, Gradoni L, Scarlata F, Gramiccia M, Giordano S, Russo R, et al. Epidemiologic surveillance of visceral leishmaniasis in Sicily, Italy. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Jul;57(1):75–8.
  123. Deray G. Amphotericin B nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother*. 2002 Jan 1;49(suppl\_1):37–41.
  124. Ardehali S, Sadeghi-Hassanabadi A, Moaddeb A, Abdollahi B, Malek-Hosseini Z, Evans DA. The characterization of *Leishmania* from patients with lymphadenopathy in Shiraz, Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995 Aug;89(4):370–1.
  125. Horrillo L, San Martín JV, Molina L, Madroñal E, Matía B, Castro A, et al. Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Mar;21(3):269–73.
  126. Bell DW, Carmichael JAG, Williams RS, Holman RL, Stewart PD. Localized leishmaniasis of lymph nodes. *Br Med J*. 1958;1(5073):740.
  127. Rios Martín JJ, Otal Salaverrí C, González-Cámpora R. Intraparotid *Leishmania donovani* lymphadenitis: diagnosis by fine needle aspiration. *Acta Cytol*. 1993

Oct;37(5):843–5.

128. Tallada N, Raventós A, Martínez S, Compañó C, Almirante B. Leishmania lymphadenitis diagnosed by fine-needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol.* 1993 Dec;9(6):673–6.
129. Nathalie C-L, Maxime B, Josee A, Juliette H, Michel KJ, Christelle E, et al. Localized leishmanial lymphadenitis: an unusual manifestation of the disease in an immunocompetent patient. *Histopathology.* 2009 Jul;55(1):124–6.
130. Garcia-Gonzalez R, Sanz I, Saus C, Calleja JL. Localized lymphadenitis due to leishmania. Diagnosis by fine needle aspiration cytology. *Postgrad Med J.* 1990;66(774):326.
131. Harms G, Zenk J, Martin S, Kokozidou M, P&#x000FC;schel W, Bienzle U, et al. Localized Lymphadenopathy Due to Leishmanial Infection. *Infection.* 2001 Dec 1;29(6):355–6.
132. Aoun K, Ben Romdhane N, Bouratbine A, Limam F. [Isolated adenopathy in leishmaniasis due to *Leishmania infantum*]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. 2002 Dec 21;31(40):1890–2.
133. Hurlot Q, Fillaux J, Laurent C, Berry A, Hofman P, Marchou B, et al. A case report of isolated lymphadenopathy revealing localized leishmanial lymphadenopathy in an asthenic 25-year-old man. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016 Jul 22 [cited 2018 Nov 4];95(29). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5265748/>
134. 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.
135. Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol.* 2008 Jun;10(6):1221–34.
136. Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2014 May;58(10):1424–9.
137. Asano S. Granulomatous lymphadenitis. *J Clin Exp Hematop JCEH.* 2012;52(1):1–16.

# APÉNDICES

APÉNDICE 1 y 2: Consentimientos informados para el estudio de Biomarcadores:

1. ESTUDIO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES ENFERMOS CON LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS.
2. ESTUDIO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES CURADOS DE LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS.

APÉNDICE 3 y 4: Artículos publicados en revistas internacionales que incluyen parte de los resultados de esta tesis:

3. *Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain)*. Horrillo L, San Martín JV, Molina L, Madroñal E, Matía B, Castro A, García Martínez J, Barrios A, Cabello N, García-Arata I, Casas JM, Ruiz Giardín JM. *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2015 Mar;21(3):269–73.
4. *Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by L. infantum in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned?* Luis Horrillo, Alicia Castro, Belén Matía, Laura Molina, Jesús García Martínez, Jerónimo Jaqueti, Isabel García-Arata, Eugenia Carrillo, Javier Moreno, José Manuel Ruiz-Giardín y Juan San Martín. *Parasites & Vectors*. Article number: 359 (2019).



## DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION

Título del Estudio de Investigación:

ESTUDIO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES ENFERMOS CON LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS

**INVESTIGADORES:** Juan Víctor San Martín<sup>1</sup>, Luis Horrillo<sup>1</sup>, Alicia Castro<sup>1</sup>, Elena Madroñal<sup>1</sup>, Belén Matía<sup>1</sup>, Alberto Romero<sup>2</sup>, Marta Aguado<sup>2</sup>, Laura Molina Esteban<sup>3</sup>, Eugenia Carrillo<sup>4</sup>, Javier Moreno<sup>4</sup>.

1 Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Madrid.

2 Servicio de Dermatología. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Madrid

3 Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Madrid

4 Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

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. El centro coordinador del estudio será el Hospital de Fuenlabrada en colaboración con la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas (Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid). El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital de Fuenlabrada.

**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 receptores de trasplante de órgano sólido.

El fin de este estudio es evaluar la respuesta inmunológica frente a la Leishmania en los pacientes antes y después del tratamiento de la misma. Este estudio representará la mayor recopilación de datos realizada en Europa sobre esta enfermedad 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 se le ha detectado la enfermedad.

Se espera que participen unas 50 personas en el estudio.

### **¿En qué consiste mi participación?**

Si usted decide tomar parte en este estudio se le asignarán un total de 4 visitas con los investigadores. Las visitas estarán integradas en la asistencia que recibirá por su médico habitual, que le realizará el seguimiento que precise aunque decida no participar en el estudio

**Día 0:** Esta visita se realizará ANTES del tratamiento de la enfermedad. En esta primera visita le tomarán una muestra de sangre. Estas muestras se utilizarán como punto de referencia para comprobar cómo responde su sistema inmunológico.

**Mes 3:** Se realizará un breve cuestionario sobre síntomas o signos que hayan podido aparecer en el tiempo transcurrido DESPUÉS del tratamiento y se tomarán nuevas muestras de sangre.

**Mes 6:** En esta visita se realizará de nuevo el mismo cuestionario y se tomarán muestras de sangre.

**Mes 12:** En esta visita se realizará de nuevo el mismo cuestionario y se tomarán las últimas muestras de sangre y orina.

En cada visita le tomarán una muestra de sangre (15cc). Esta muestra se utilizará para detectar si persiste infección latente por Leishmania y para comprobar cómo ha respondido su sistema inmunológico.

### **¿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.

Sólo 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 sólo pueden acceder a ella los miembros del equipo investigador y las autoridades sanitarias en el ejercicio de sus funciones.

Una parte de las muestra (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 (5cc) de las muestras 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 del Biobanco.

#### **¿Existen intereses económicos en este estudio?**

Vd. no será retribuido por participar.

Esta investigación es promovida por la Red de Investigación Cooperativa de Enfermedades Tropicales (RICET), que aporta fondos para el estudio. El hospital de Fuenlabrada, como centro participante en el estudio, recibirá los fondos aportados por la RICET que serán utilizados por los investigadores para su uso exclusivo en actividades científicas.

#### **¿Quién me puede dar más información?**

Para más información puede contactar con el Dr. San Martín, Investigador Principal del Hospital de Fuenlabrada, o con los co-investigadores (Dr. Luis Horrillo, Dra. Alicia Castro, Dra. Elena Madroñal, Dra Belén Matía) 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 LA EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES ENFERMOS CON LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS

INVESTIGADORES: Juan Víctor San Martín<sup>1</sup>, Luis Horrillo<sup>1</sup>, Alicia Castro<sup>1</sup>, Elena Madroñal<sup>1</sup>, Belén Matía<sup>1</sup>, Alberto Romero<sup>2</sup>, Marta Aguado<sup>2</sup>, Laura Molina Esteban<sup>3</sup>, Eugenia Carrillo<sup>4</sup>, Javier Moreno<sup>4</sup>.

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 LA EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES ENFERMOS CON LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS”. 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 LA EVOLUCIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES ENFERMOS CON LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS”

SI  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:  SI  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  SI  NO Teléfono o E-mail de contacto.....

4. Autorizo a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales  SI  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:

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

PARTICIPANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....

## DOCUMENTO DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACION

Título del Estudio de Investigación:

ESTUDIO SOBRE LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES CURADOS DE LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS

**INVESTIGADORES:** Juan Víctor San Martín<sup>1</sup>, Luis Horrillo<sup>1</sup>, Alicia Castro<sup>1</sup>, Elena Madroñal<sup>1</sup>, Belén Matía<sup>1</sup>, Alberto Romero<sup>2</sup>, Marta Aguado<sup>2</sup>, Laura Molina Esteban<sup>3</sup>, Eugenia Carrillo<sup>4</sup>, Javier Moreno<sup>4</sup>.

1 Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Madrid.

2 Servicio de Dermatología. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Madrid

3 Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Fuenlabrada. Madrid

4 Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

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. El centro coordinador del estudio será el Hospital de Fuenlabrada en colaboración con la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas (Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid). El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital de Fuenlabrada.

**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 inocula 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 receptores de trasplante de órgano sólido.

El fin de este estudio es comprobar que todos los pacientes curados de una leishmaniasis tienen una buena respuesta celular frente a la Leishmania. Este estudio representará la mayor recopilación de datos realizada en Europa sobre esta enfermedad 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 ha padecido la enfermedad.  
Se espera que participen unas 150 personas en el estudio.

### **¿En qué consiste mi participación?**

Si usted decide tomar parte en este estudio se le asignará una única visita con los investigadores.

En dicha visita le tomarán una muestra de sangre (15cc). Esta muestra se utilizará para detectar si existe infección latente por Leishmania y para comprobar cómo ha respondido su sistema inmunológico.

### **¿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.

Sólo 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 sólo pueden acceder a ella los miembros del equipo investigador y las autoridades sanitarias en el ejercicio de sus funciones.

Una parte de la muestra (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 (5cc) de las muestras 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 del Biobanco.

### **¿Existen intereses económicos en este estudio?**

Vd. no será retribuido por participar.

Los investigadores no recibirán remuneración económica por participar.

Esta investigación es promovida por la Red de Investigación Cooperativa de Enfermedades Tropicales (RICET).

**¿Quién me puede dar más información?**

Para más información puede contactar con el Dr. San Martín, Investigador Principal del Hospital de Fuenlabrada, o con los co-investigadores (Dr. Luis Horrillo, Dra. Alicia Castro, Dra. Elena Madroñal, Dra Belén Matía) 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 LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES CURADOS DE LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS

INVESTIGADORES: Juan Víctor San Martín<sup>1</sup>, Luis Horrillo<sup>1</sup>, Alicia Castro<sup>1</sup>, Elena Madroñal<sup>1</sup>, Belén Matía<sup>1</sup>, Alberto Romero<sup>2</sup>, Marta Aguado<sup>2</sup>, Laura Molina Esteban<sup>3</sup>, Eugenia Carrillo<sup>4</sup>, Javier Moreno<sup>4</sup>.

**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 LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES CURADOS DE LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS”. 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 LA RESPUESTA CELULAR DE PACIENTES CURADOS DE LAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIASIS” 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:

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

PARTICIPANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de..... de.....

## Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain)

L. Horrillo<sup>1</sup>, J. V. San Martín<sup>1,2</sup>, L. Molina<sup>3</sup>, E. Madroñal<sup>1</sup>, B. Matía<sup>1</sup>, A. Castro<sup>1</sup>, J. García-Martínez<sup>3</sup>, A. Barrios<sup>1,2</sup>, N. Cabello<sup>1,2</sup>, I. G. Arata<sup>3</sup>, J. M. Casas<sup>1</sup> and J. M. Ruiz Giardin<sup>1,2</sup>

1) Department of Internal Medicine, 2) Infectious Diseases Area and 3) Microbiology Area, Laboratory Medicine Department, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain

### Abstract

Since 2009, the largest reported outbreak of leishmaniasis by *Leishmania infantum* in Europe was reported in Fuenlabrada, Spain. In our hospital, 90 adults with localized leishmanial lymphadenopathy (LLL) or visceral leishmaniasis (VL) were treated during this outbreak; 72% were men, and the mean age was 46.2 years (range 15–95 years). A total of 17 cases (19%) were LLL, an atypical form with isolated lymphadenopathies without other symptoms. All LLL cases occurred in immunocompetent subjects, and only one subject (6%) was a native of sub-Saharan Africa. Diagnosis was performed by fine needle aspiration cytology of the lymphadenopathy. Serology was negative in 38%. LLL outcomes at 6 months were benign, even with doses of liposomal amphotericin B that were often lower (10 mg/kg) than those recommended for VL in Mediterranean areas. A total of 73 subjects (81%) presented with typical VL; 66% of this group were immunocompetent, and 50% of those who were immunocompetent were descendants of natives of sub-Saharan Africa. The rK39 test and polymerase chain reaction were the most useful tests for confirmation of the diagnosis. An initial response to treatment was observed in 99% of cases, and relapses occurred in 14% of cases. Leishmaniasis should be included in the differential diagnosis of isolated lymphadenopathies in endemic areas. LLL could be considered a more benign entity, one different than VL, and less aggressive management should be studied in future investigations.

Clinical Microbiology and Infection © 2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Drug therapy, *Leishmania infantum*, leishmaniasis, localized leishmanial lymphadenopathy, neglected diseases, outbreak, serologic tests, signs and symptoms, visceral

**Original Submission:** 19 May 2014; **Revised Submission:** 18 October 2014; **Accepted:** 21 October 2014

Editor: E. Bottieau

**Article published online:** 29 October 2014

**Corresponding author:** L. Horrillo, Department of Internal Medicine, Hospital Universitario de Fuenlabrada, C/ Camino del Molino, n° 2, Fuenlabrada, CP 28942, Madrid, Spain

**E-mail:** [horrich@hotmail.com](mailto:horrich@hotmail.com)

The first two authors contributed equally to this article, and both should be considered first author.

### Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease caused by the *Leishmania* spp. parasite and is transmitted to humans by the bite of phlebotome sandflies. It is an endemic disease in 98 countries,

including those of the Mediterranean basin [1]. Visceral leishmaniasis (VL) is the most serious clinical form of this disease; symptoms include weight loss, intermittent fever and splenomegaly [2]. Without treatment, it can be fatal, in contrast to cutaneous leishmaniasis (CL), which presents a less aggressive course.

Lymphadenopathies are not common in VL, except in Eastern Africa [3], but some forms of CL present lymphadenopathies near the cutaneous injury [4]. Nevertheless, in the Mediterranean area, isolated cases of an infrequent form of leishmaniasis involving isolated lymphadenopathies without fever or skin lesions have been described in a few case reports as localized leishmanial lymphadenopathy (LLL) [5–9]. The clinical

management of LLL is not well defined because it is not a classic form of VL or CL [5,8].

Leishmaniasis in Spain is endemic and is caused by *Leishmania infantum*, which can cause VL or CL, and whose typical reservoir is the dog. Since July 2009, an outbreak of leishmaniasis has been developing south of Madrid, primarily in the city of Fuenlabrada; by December 2012, this outbreak had already affected more than 400 people (making it the largest reported community outbreak in Europe), consisting of one-third VL and two-thirds CL. The epidemiologic features and control measures of this outbreak have been reported by Arce et al. [10]. As peculiarities of the outbreak, a genotype of *L. infantum* was found (genotype L-920 or L-962, ITS LOMBARDI) [11], and a new reservoir, the hare, was identified [12]. Despite reaching a peak incidence in 2011, the outbreak as of this writing in 2014 remains active.

Our aim was to describe this atypical presentation characterized by lymphadenopathy and to highlight its differences from the usual form of VL.

## Materials and methods

### Design

Using a prospective database of all adult patients with VL treated at the Hospital Universitario de Fuenlabrada (HUF) during the epidemic outbreak (1 June 2009 to 31 May 2013), we retrospectively analysed the disease's epidemiologic, clinical, diagnostic and treatment characteristics. All of the patients were followed for at least 6 months after treatment; the study ended 1 February 2014.

### Case definitions

**Visceral leishmaniasis (VL).** Typical symptoms or signs (prolonged and intermittent fever, weight loss, pancytopenia or splenomegaly) with serologic or parasitologic confirmation approved by the World Health Organization (WHO) report [1].

**Localized leishmanial lymphadenopathy (LLL).** Lymphadenopathies (>1 cm cervical or axillar, >2 cm inguinal) as the first clinical manifestation, with parasitologic confirmation by stained smear, culture or polymerase chain reaction (PCR) from lymph node biopsy or aspirated material [5].

**Initial response to treatment.** Clinical improvement at the end of treatment [1].

**Relapse.** Reappearance of clinical disease after response to initial treatment [1].

**Definitive response to treatment.** Absence of clinical disease at least 6 months after completing treatment [1].

### Patients

All patients older than 14 with case definition criteria treated at the HUF were included in the study. Solid-organ transplant recipients with VL were not included because these recipients were referred to other centres.

### Laboratory diagnostic methods

Antileishmanial antibodies were mainly assayed using an immunochromatographic test based on the rK39 antigen (SD Leishmania Ab; Standard Diagnostics) and using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of total antibodies (leishmania ELISA IgG + IgM; Vircell Microbiologists). In a few patients, antibodies were detected using indirect immunofluorescence (Leishmania Indirect Immunofluorescence Antibody Test; Vircell); titres of  $\geq 1:80$  were considered significant. Leishmanial cultures were created by inoculating the tissue specimens or the buffy coat layer of peripheral blood onto Novy-McNeal-Nicolle medium. All cultures were incubated at room temperature (22°C to 25°C) and were examined every other week for 6 weeks. Tissue samples were stained with May-Grünwald-Giemsa or periodic acid-Schiff. DNA extraction and amplification of a portion of the 18S rDNA of *Leishmania* spp. were performed as described elsewhere [13].

### Data collection and statistical analysis

Epidemiologic, clinical, diagnostic and treatment characteristics were collected in a specifically designed case report form.

All statistical analyses were conducted by SPSS software, v11.5 (SPSS).

The qualitative variables are expressed as the percentages of the total number of patients. The quantitative variables appear as the mean and standard deviation or medians and interquartile ranges (for skewed variables). The variables were compared depending on the clinical form, VL vs. LLL. To compare the qualitative variables, we used a chi-square test or Fisher's test when the number of cases was fewer than five. The quantitative variables were evaluated for normal distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test. Normal quantitative variables were compared by analysis of variance. Nonnormal quantitative variables were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test.

## Results

In total, 90 adults who fulfilled the case definitions were treated at the hospital during this outbreak from 1 June 2009 through 31 May 2013; 65 (72%) were men, and the mean age of the subjects was 46.2 years (standard deviation 16.2; range 15–95 years).

A total of 73 cases (81%) fulfilled the criteria of typical VL, and 17 (19%) were LLL. The epidemiologic, clinical, laboratory, diagnostic and outcome features of both groups are listed in Table 1.

### Localized leishmanial lymphadenopathy

LLL appeared as long evolution lymphadenopathies (median 60 days, interquartile range 75), and no patient presented either fever or any other systemic symptom during the evolution.

Nine cases (53%) had more than one lymphadenopathy, with two (12%) in different lymphadenopathy areas. The most frequent location was the cervical area (11 cases, 65%), including the laterocervical, submandibular and parotid chains. Six patients (35%) presented with inguinal lymphadenopathies, three presented with (18%) axillary lymphadenopathies, one presented with supraclavicular lymphadenopathy and one presented with costal lymphadenopathy. Six patients (35%) presented with a cutaneous lesion suspicious of CL before the appearance of the lymphadenopathy.

Diagnosis was performed in all LLL cases by fine needle aspiration cytology (FNAC) of the lymphadenopathy. The pathologic finding was nonnecrotizing granulomatous lymphadenitis with *Leishmania* parasites in all cases, except for one that did not exhibit granulomas. Serologic test results are shown in Table 1.

One patient did not receive any treatment because of the spontaneous resolution of the lymphadenopathy 6 months after diagnosis. The rest were treated with liposomal amphotericin B (LAB), but different doses were used depending on physician decision. Four patients were treated with 10 mg/kg, five with 15 mg/kg, one with 18 mg/kg and six with 21 mg/kg of LAB.

One patient whose disease presented exclusively in the cervical nodes at the first visit developed new inguinal

lymphadenopathies by the end of treatment (21 mg/kg LAB) and was considered an initial treatment failure. *Leishmania* was confirmed by FNAC of both lymphadenopathies, cervical and inguinal. This patient was the only one with LLL who had clinical and radiologic splenomegaly and had anaemia, leukopenia and thrombocytopenia (Table 1). She was treated again with 40 mg/kg of LAB, and her disease showed a definitive response. The rest of the patients experienced an initial and definitive response to treatment, and regardless of the dose used, all exhibited definitive response to treatment at 6 months (Table 1).

### Typical VL

In total, 73 patients had typical manifestations of VL. Of these patients, 48 were immunocompetent (66%) and 25 (34%) were administered some potentially immunosuppressive drug or had disease: nine (12%) had chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection, ten (14%) were receiving immunosuppressive drugs (anti-tumour necrosis factor drugs, methotrexate and/or steroids), three (4%) had hepatic cirrhosis and three (4%) had active solid malignancies.

There were only four patients without fever (Table 1); three were in patients with HIV, two were assessed for pancytopenia and one was assessed for hypertransaminasemia. The only immunocompetent patient without fever was diagnosed because of thrombocytopenia.

Only one patient with typical VL had lymphadenopathies. He was coinfecting with HIV and leishmaniasis. FNAC showed pathologic changes related to HIV but showed no evidence of *Leishmania*.

Stained smear of bone marrow was positive for *Leishmania* in 44% cases and PCR of bone marrow in 91%. Serologic test results are compared with LLL in Table 1.

**TABLE 1.** Clinical features of subjects with VL and LLL

Clinical feature	VL (n = 73)	LLL (n = 17)	Total (n = 90)	p
Male, n (%)	56 (77%)	9 (53%)	65 (72%)	0.049
Age (mean ± SD)	46.3 ± 16.7	45.5 ± 14.2	46.2 ± 16.2	0.858
Immigrant, n (%)	33 (45%)	2 (12%)	35 (39%)	0.012
Sub-Saharan native, n (%)	26 (36%) <sup>a</sup>	1 (6%)	27 (30%)	0.014
Immunocompetent, n (%)	48 (66%) <sup>a</sup>	17 (100%)	65 (72%)	0.002
Fever, n (%)	69 (95%)	0 (0%)	69 (77%)	<0.001
Clinical splenomegaly, n (%)	27 (37%)	1 (6%)	28 (31%)	0.013
Radiologic splenomegaly <sup>a</sup>	64/68 (94%)	1/7 (14%)	65/75 (87%)	<0.001
Anaemia (Hb < 12 mg/dL), n (%)	65 (89%)	1 (6%)	66 (73%)	<0.001
Leukopenia (<4000/mm <sup>3</sup> ), n (%)	64 (88%)	1 (6%)	65 (72%)	<0.001
Thrombocytopenia (<150 000/mm <sup>3</sup> ), n (%)	69 (95%)	1 (6%)	70 (78%)	<0.001
C-reactive protein >2 mg/dL <sup>b</sup>	65/68 (96%)	1/14 (7%)	66/82 (81%)	<0.001
Ferritin >1000 mg/dL <sup>b</sup>	43/56 (77%)	0/8 (0%)	43/64 (67%)	<0.001
Erythrocyte sedimentation rate >30 mm/h <sup>b</sup>	25/27 (93%)	1/4 (25%)	26/31 (84%)	0.008
rk39 test <sup>c</sup>	32/48 (67%)	3/6 (50%)	35/53 (66%)	0.352
ELISA/IFA <sup>b</sup>	70/71 (99%)	8/13 (62%)	78/84 (93%)	<0.001
Initial response to treatment	69/70 (99%)	15/16 (94%)	84/86 (98%)	0.354
Relapse	10/70 (14%)	0/16 (0%)	10/86 (12%)	0.099

VL, visceral leishmaniasis; LLL, leishmanial lymphadenopathy; Hb, haemoglobin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFA, immunofluorescent antibody.

<sup>a</sup>For VL in immunocompetent subjects, 50% of cases occurred in descendants of sub-Saharan natives.

<sup>b</sup>Number of cases with positive result on diagnostic test/total number of cases with diagnostic test performed (%).

Of the 73 patients, three did not receive any therapy: two patients did not show up to receive treatment and were lost to follow-up, and the other patient died from complications of advanced cirrhosis before initiating therapy.

A total of 70 patients with VL received therapy with LAB. An initial response to treatment was observed in 69 cases (99%), and there were ten relapses (14%) during follow-up (Table 1). All HIV patients were considered for receipt of monthly secondary prophylaxis. In total, five of the patients who experienced relapse (50%) were natives of sub-Saharan Africa, including two HIV patients who voluntarily discontinued secondary prophylaxis. After retreatment of the relapse, seven patients were cured and three were not: one HIV patient with a CD4 count of less than 100 cell/ $\mu$ L at the time the study closed experienced four relapses, and two patients with severe comorbidity died before completing repeat treatment.

## Discussion

Here we report our clinical experience of the largest outbreak of VL due to *L. infantum* in Europe to date. We diagnosed a substantial number of cases of LLL, an atypical presentation that has rarely been reported in the literature [5–9]. To our knowledge, this is the first series of cases of LLL caused by *L. infantum*, and we compared it to VL during the outbreak.

LLL exclusively affected immunocompetent individuals, whereas immunosuppressed patients were 34% of VL cases. The immune factors that explain why *L. infantum* produces VL, LLL or CL in immunocompetent individuals remain unknown. It is remarkable the number of VL cases in immunocompetent descendants of natives of sub-Saharan Africa (ratio 1:1), whereas only one patient had LLL (ratio 1:16). In addition, in this outbreak, very few CL cases were found in natives of sub-Saharan Africa [10,14]. The reasons for this difference might be due to external factors (habits, house conditions or location) that suggested a major exposure of sub-Saharan patients to *Phlebotomus*. However, the epidemiologic studies performed in that zone have not found any exposure factor, such as contact with dogs, the presence of vectors in their domestic or peridomestic environment or any of the classical environmental risk factors [10]. Thus, the difference in susceptibility to VL among natives of sub-Saharan Africa and natives of Spain could be explained by genetic differences in the predisposition to this disease, as others have suggested [15]. More studies should be performed to prove this.

LLL presented an indolent evolution, without systemic sequelae and without blood count and biochemical laboratory test abnormalities. This suggests that patients were able to control the infection. Dissemination to several

lymphadenopathy areas was only confirmed in one patient, and this patient was the only one who had features of VL, i.e. splenomegaly and pancytopenia. In contrast, fever, splenomegaly and pancytopenia were present in more than 90% of the typical VL cases, and as expected, this combination of findings was the most frequent form of presentation [1].

We should include LLL in the differential diagnosis of any isolated lymphadenopathy, at least in areas endemic for leishmaniasis, such as Spain and the Mediterranean basin; diagnosis is easy with FNAC [5–9]. Serology is not useful in CL because most patients have negative results [1]. In our LLL cases, we found a high proportion of false-negative results by serology (50% for rK39 test, 40% for ELISA/immunofluorescent antibody (IFA) test; Table 1). However, for VL cases, rK39 antigen had a 100% predictive positive value and ELISA/IFA had 99% sensitivity. These results in VL are similar to those reported in the literature because the rK39 test is considered a more specific test than ELISA/IFA [16].

WHO recommendations for *L. infantum* VL treatment in immunocompetent individuals in the Mediterranean area include LAB at a total dose of 18 to 21 mg/kg [17–19], but treatment for LLL is not standardized, and no recommendations are provided in the WHO report [1]. In previous case reports, LLL was supposed to be treated like the visceral form, but treatment was diverse: treated but drug not reported [9], antimonial therapy [6], LAB but dose not reported [8], LAB 10 mg/kg per day [7] and LAB 30 mg/kg total dose [5]. We found that clinical characteristics, diagnostic profile and evolution of LLL seem to be closer to CL than to typical VL, and we have documented spontaneous clinical resolution of lymphadenopathies without treatment in one patient. However, concerns about a change of immunocompetence and parasite dissemination exist. Previous LLL cases had been treated as VL [5,6,8,9]. In one patient, we found dissemination to several lymphadenopathy locations and splenomegaly, although we think this was a true case of VL because of anemia and splenomegaly.

In our opinion, there are reasons to propose the systemic treatment of this entity, but there are also reasons to support a lower dose than that currently recommended for VL. A lower dose of LAB (10 mg/kg) has been proved to not be inferior to the conventional dose in VL due to *Leishmania donovani* [1,20]; LLL patients are immunocompetent, so their bodies can partially control the infection; the number of parasites in the total body is thus expected to be lower in LLL than in VL, and lower toxicity is desirable. We found that 4 LLL patients treated with LAB at a dose of 10 mg/kg had safe outcome at 6 months, and we suggest that in the absence of splenomegaly, pancytopenia or elevation of phase reactants, it can be a treatment option for LLL that must be investigated in the future.

Our results have limitations inherent to observational studies, which do not allow definitive conclusions concerning diagnostic and treatment regimens to be made because of the requirement for comparative clinical trials. This unexpected outbreak did not allow us to design a randomized controlled trial.

To summarize the principal lessons learned, we emphasize that we should include leishmaniasis in the differential diagnosis of isolated lymphadenopathies in immunocompetent subjects in endemic areas. LLL usually had an indolent outcome different from VL and could be treated with lower doses of LAB than that recommended for VL in the Mediterranean area, although further data are needed.

### Transparency declaration

This study received financial support from the 'Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET + RD12/0018/0008), VI PN de I + D + I 2008–2011, ISCIII—Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa.' All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

### References

- [1] World Health Organization (WHO); WHO Expert Committee on Control of Leishmaniasis (Geneva). Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Geneva: World Health Organization; 2010.
- [2] World Health Organization. Recommended surveillance standards. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1999.
- [3] Zijlstra EE, Ali MS, El-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar in displaced people from southern Sudan: epidemiological, clinical and therapeutic findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:365–9.
- [4] Sousa Ade Q, Parise ME, Pompeu MM, Coelho Filho JM, Vasconcelos IA, Lima JW, et al. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1995;53:380–5.
- [5] Ignatius R, Loddenkemper C, Woitzik J, Schneider T, Harms G. Localised leishmanial lymphadenopathy: an unusual manifestation of leishmaniasis in a traveler in southern Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:1213–5.
- [6] García-González R, Sanz I, Saus C, Calleja JL. Localized lymphadenitis due to leishmania. Diagnosis by fine needle aspiration cytology. *Postgrad Med J* 1990;66:326.
- [7] Cardot-Leccia N, Benchetrit M, Audouin J, Haudebourg J, Karsenty JM, Estran C, et al. Localized leishmanial lymphadenitis: an unusual manifestation of the disease in an immunocompetent patient. *Histopathology* 2009;55:124–5.
- [8] Harms G, Zenk J, Martin S, Kokozidou M, Püschel W, Bienzle U, et al. Localized lymphadenopathy due to leishmanial infection. *Infection* 2001;29:355–6.
- [9] Vera-Alvarez J, Marigil-Gomez M, Abascal-Aborreta M, Lacasa-Laliena M. Diagnosis of localized *Leishmania* lymphadenitis by fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 1999;43:529–53.
- [10] Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, et al. Reemergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill* 2013;18:20546.
- [11] Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill* 2013;18:20545.
- [12] 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;190:268–71.
- [13] Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:1529–35.
- [14] 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.
- [15] Ibrahim ME, Lambson B, Yousif AO, Deifalla NS, Alnaiem DA, Ismail A, et al. Kala-azar in a high transmission foci: an ethnic and geographical dimension. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:941–4.
- [16] Maia Z, Lirio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1484.
- [17] Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1617–20.
- [18] Cascio AA. 6 day course of liposomal amphotericin B in the treatment of infantile visceral leishmaniasis: the Italian experience. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:217–20.
- [19] Sereti E, Karamboula A, Papathanasiou D, Krikos X, Saroglou G. Two doses of a lipid formulation of amphotericin B for the treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2003;36:560–6.
- [20] Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* 2010;362:504–12.

RESEARCH

Open Access



# Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned?

Luis Horrillo<sup>1,2†</sup>, Alicia Castro<sup>1</sup>, Belén Matía<sup>1</sup>, Laura Molina<sup>3</sup>, Jesús García-Martínez<sup>3</sup>, Jerónimo Jaqueti<sup>3</sup>, Isabel García-Arata<sup>3</sup>, Eugenia Carrillo<sup>4</sup>, Javier Moreno<sup>4</sup>, José Manuel Ruiz-Giardin<sup>1</sup> and Juan San Martín<sup>1\*†</sup> 

## Abstract

**Background:** An outbreak of leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* was declared in the southwest of the Madrid region (Spain) in June 2009. This provided a unique opportunity to compare the management of visceral leishmaniasis (VL) in immunocompetent adults (IC-VL), patients with HIV (HIV-VL) and patients receiving immunosuppressants (IS-VL).

**Methods:** A cohort of adults with VL, all admitted to the Hospital Universitario de Fuenlabrada between June 2009 and June 2018, were monitored in this observational study, recording their personal, epidemiological, analytical, diagnostic, treatment and outcome variables.

**Results:** The study population was made up of 111 patients with VL (10% HIV-VL, 14% IS-VL, 76% IC-VL). Seventy-one percent of the patients were male; the mean age was 45 years (55 years for the IS-VL patients,  $P=0.017$ ). Fifty-four percent of the IC-VL patients were of sub-Saharan origin ( $P=0.001$ ). Fever was experienced by 98% of the IC-VL patients vs 73% of the LV-HIV patients ( $P=0.003$ ). Plasma ferritin was  $>1000$  ng/ml in 77% of the IC-VL patients vs 17% of the LV-HIV patients ( $P=0.007$ ). Forty-two percent of patients fulfilled the criteria for haemophagocytic lymphohistiocytosis. RDT (rK39-ICT) serological analysis returned sensitivity and specificity values of 45% and 99%, respectively, and ELISA/iIFAT returned 96% and 89%, respectively, with no differences in this respect between patient groups. Fourteen (13.0%) patients with VL experienced treatment failure, eight of whom were in the IC-VL group. Treatment with  $<21$  mg/kg (total) liposomal amphotericin B (LAB) was associated with treatment failure in the IC-VL patients [ $P=0.002$  (OR: 14.7; 95% CI: 2.6–83.3)].

**Conclusions:** IS-VL was more common than HIV-VL; the lack of experience in dealing with IS-VL is a challenge that needs to be met. The clinical features of the patients in all groups were similar, although the HIV-VL patients experienced less fever and had lower plasma ferritin concentrations. RDT (rK39-ICT) analysis returned a good specificity value but a much poorer sensitivity value than reported in other scenarios. The patients with HIV-VL, IS-VL and IC-VL returned similar serological results. Current guidelines for treatment seem appropriate, but the doses of LAB required to treat patients with HIV-VL and IS-VL are poorly defined.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Outbreak, Diagnosis, Therapy, Immunocompromised host, HIV

\*Correspondence: juanvictor.san@salud.madrid.org

<sup>†</sup>Luis Horrillo and Juan San Martín contributed equally to this work

<sup>1</sup> Área de Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Camino del Molino 2, 28942 Fuenlabrada, Madrid, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe clinical manifestation of disease caused by *Leishmania* parasites. In June 2009, an outbreak of leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* was declared in the southwest of the Madrid region (Spain); the focus was an urban park in the town of Fuenlabrada. The incidence before the outbreak was around 0.2 cases/100,000 inhabitants in the above region, rising to 43.5/100,000 in Fuenlabrada during the outbreak [1]. With more than 700 cases declared by December 2016 (the date of the last official report [1]) the Fuenlabrada outbreak is the largest in Europe to date, and has not yet been declared over. Although most people affected during this outbreak have presented with cutaneous leishmaniasis, many patients have presented with VL and most of VL patients were immunocompetent and of all ages [2].

Large outbreaks involving zoonotic parasites such as *L. infantum* are very uncommon, especially in a European city [3]. The Fuenlabrada outbreak has some peculiarities. For the first time, hares appear to be the main reservoir (dogs, the usual reservoir for *L. infantum*, appear to have no role) [4]. Furthermore, it involves the ITS-LOMBARDI strain instead of the more common MON-1 strain; this new, poorly characterized strain was isolated from persons with different clinical manifestations of the disease during the outbreak [5]. The clinical behaviour of the disease in such an unusual scenario was therefore unknown. Indeed, we reported the appearance of cases of *L. infantum*-induced localized leishmanial lymphadenopathy (LLL) during the outbreak. Completely different to VL, this rare and fortunately benign clinical form is not described in clinical guidelines [6].

It was in 2010 that the WHO first recommended the management of VL to be individualised according to the causal species, the region of the world and patient immunological status {i.e. immunocompetent (IC-VL), co-infected with HIV (HIV-VL) or immunosuppressed (IS-VL) [7]}. These recommendations have been maintained in subsequent guidelines, and there have been no essential changes to recommendations on the management of VL in the Mediterranean area. However, recommendation levels regarding some aspects of diagnosis and treatment are low [3, 8, 9]. For instance, there is no certainty regarding the usefulness of the rapid diagnostic test (RDT) based on rK39 since the results reported have been highly variable by region [10]. In addition, the validity of serological tests for HIV-VL patients in the HAART era is unknown [11] and treatment recommendations for *L. infantum*-induced IC-VL, HIV-VL and IS-VL are based on small series of patients and even individual cases [3, 8, 9].

In this scenario of uncertainty, the aim of the present work was to describe our clinical experience in the management of such patients, with special attention paid to their immunological status. To our knowledge, this is the first time that personal, epidemiological, analytical, diagnostic, treatment and outcome variables for patients with IC-VL, HIV-VL and IS-VL have been compared for the same outbreak.

## Methods

### Design

This work was designed as a longitudinal observational study of a cohort of consecutive adult patients with VL treated at the Hospital Universitario de Fuenlabrada (HUF) from June 2009 to June 2018. A descriptive analysis was made of their clinical characteristics, the diagnostic methods employed, their treatment and the progress of their disease.

### Fuenlabrada hospital and the surrounding population

The HUF is the only public reference hospital for the city of Fuenlabrada. Located in the southwest of the Madrid region (Spain), its 400 beds serve a population of 221,986 people.

### Inclusion and exclusion criteria

All patients had to be at least 14 years of age at the time of diagnosis and fulfil the case definition for VL (see below). Patients who had received a solid organ transplant were excluded.

### Definitions

The case definition of VL was clinical manifestations compatible with the condition plus at least one of the following [7]: (i) positive parasitological test (optical microscopy of bone marrow aspirate, or blood/bone marrow PCR); and (ii) positive serological [RDT rK39-ICT and ELISA/iFAT (enzyme-linked immunosorbent assay/indirect immunofluorescent antibody test)] test plus clinical response to treatment.

Patients with IC-VL were defined as those with VL with no apparent immunodeficiency, HIV-VL patients were defined as patients with VL plus chronic HIV infection, and IS-VL patients as those with VL receiving treatment with corticosteroids, methotrexate or anti-TNF drugs, regardless of the underlying disease.

Delay in diagnosis was described as the days elapsed between the patient reporting the onset of symptoms and a diagnosis being made. Treatment outcomes were described as [3]: (i) initial response: clinical improvement at the end of treatment; (ii) relapse: recurrence (meeting VL criteria once again) after initial response; (iii) definitive response/cured patient: absence of clinical

symptoms 1 year after finishing treatment or re-treatment after relapse; and (iv) failure: lack of initial response and/or relapse.

Haemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) was deemed present when at least five of the eight diagnostic criteria re-defined in 2004 by the HLH Study Group were met [12]. Only six of the eight criteria were evaluated (the absence of NK activity and soluble CD25 could not be tested): (i) fever; (ii) splenomegaly; (iii) cytopenia (affecting  $\geq 2$  of 3 lineages in the peripheral blood); (iv) hypertriglyceridaemia and/or hypofibrinogenaemia; (v) hemophagocytosis in the bone marrow, spleen or lymph nodes; and (vi) ferritin  $\geq 500$   $\mu\text{g/l}$ .

### Variables recorded and diagnostic tests performed

#### Epidemiological variables

The epidemiological variables recorded were age, gender, country of origin, ethnicity, delay in diagnosis, comorbidities (diabetes, cirrhosis, neoplasms), HIV and treatment with methotrexate, steroids or anti-TNF.

#### Clinical variables

The clinical variables recorded were symptoms at diagnosis: splenomegaly (examined physically or by ultrasonography/CT; defined as a spleen  $> 13$  cm in cephalocaudal diameter), anaemia (haemoglobin  $< 12$  mg/dl), leucopenia ( $< 4000$  leucocytes/ $\text{mm}^3$ ), thrombocytopenia ( $< 150,000$  platelets/ $\text{mm}^3$ ), C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR) and plasma ferritin.

#### Diagnostic variables and tests

Parasites were visualised by optical microscopy (bone marrow aspirate), cultivation (bone marrow aspirate) in Novy-MacNeal-Nicolle medium, or PCR-detected (*Leishmania* spp. DNA) in blood and bone marrow aspirate. All samples were sent to the National Center of Microbiology, ISCIII (Majadahonda, Madrid), for analysis.

Serological examination included immunochromatographic RDT based on antigen rK39-ICT, iFAT and/or ELISA. The RDT (rK39-ICT) test was performed using colorimetric dipsticks, employing the SD *Leishmania* Ab kit (Standard Diagnostics, INC., Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea) according to the manufacturer's instructions. These dipsticks detect antibodies against the rK39 antigen. The results are available in less than 1 h. Our hospital laboratory began using this test in April 2011. ELISA was used to detect total antibodies against *Leishmania* using the *Leishmania* ELISA IgG + IgM kit (Viracell Microbiologists, Granada, Spain). This technique is considered as reliable as iFAT and has been available at our hospital since April 2011. Before April 2011, samples were sent to the Microbiology Department of the Hospital Universitario Severo Ochoa for iFAT testing using

the *Leishmania* Indirect Immunofluorescence Antibody Test kit (Viracell Microbiologists, Granada, Spain). Titres  $\geq 1:80$  were considered positive.

#### Treatment and outcome variables

The following treatment and outcome variables were recorded: type of treatment, dose, adverse effects (creatinine  $> 0.5$  mg/dl over baseline, chills), initial response, relapse, definitive response/cure, failure and death.

#### Statistical analysis

Qualitative variables were characterized by their absolute and relative frequencies. Quantitative variables were analysed using the Kolmogorov–Smirnov test to determine if they fitted a normal distribution. Results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) for normally distributed variables, and as the medians plus interquartile range (IQR) for those that were not.

Results for categorical variables for the different patient groups were examined using the Chi-square test; when any frequency was  $< 5$ , Fisher's exact test was used. Non-categorical variables were compared using either Student's t-test (for parametric variables) or the Kruskal–Wallis test (for non-parametric variables).

Multivariate logistic regression was performed to determine the association of different variables with "failure" and "relapse". The regression model included age, sex, sub-Saharan origin, delay in diagnosis, plasma ferritin, HLH, adequacy of liposomal amphotericin B (LAB) dose, compliance with secondary prophylaxis (patients with HIV-VL) and immunological status. Significance was set at  $P < 0.05$ . All calculations were performed using SPSS v.15.0 software for Windows.

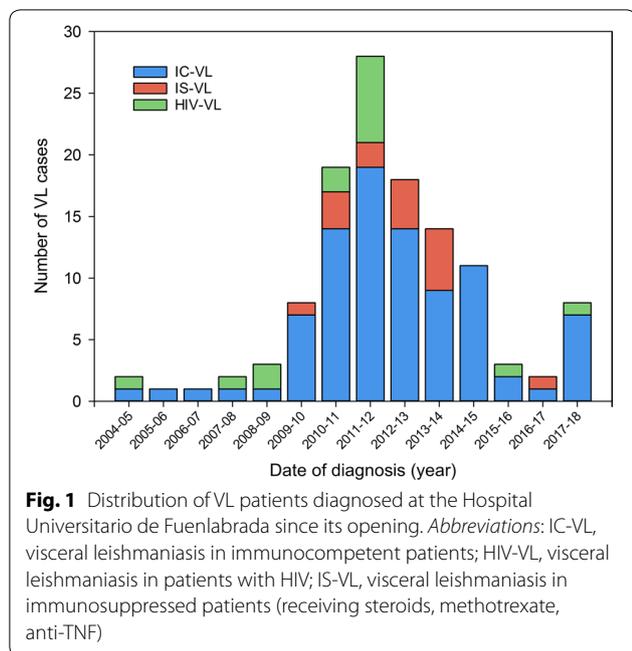
## Results

### Distribution of cases by immunological status and year

Since the beginning of the outbreak, 111 patients have met the case definition criteria for VL. Fourteen patients clinically suspected of having VL returned positive serological results (1 by RDT rK39-ICT and 13 by ELISA) but did not meet the case definition criteria. Of these 14 patients, four had autoimmune disease, two were on immunosuppressant therapy, and for two a diagnosis of Q fever was made.

The 111 confirmed cases of VL were distributed as follows: 11 (10%) HIV-VL, 16 (14%) IS-VL and 84 (76%) IC-VL; Fig. 1 shows their diagnostic distribution by year compared to previous VL cases. Five (3.5%) IC-VL patients had liver cirrhosis and three (2.1%) had some type of active non-haematological malignancy.

Tables 1 and 2 show patient baseline characteristics at the time of HIV-VL or IS-VL diagnosis. No cases of liver



tumoral disease or congenital immunodeficiency were detected (Table 2).

**Clinical features**

Table 3 and Fig. 2 show the clinical characteristics of the patients according to their immunological status.

The majority of affected immigrants came from Equatorial Guinea (n = 24) and Nigeria (n = 14), all of whom had been living in Spain for over 6 months. No significant differences were recorded for this group with respect to the

mean distance to the focus of the outbreak (mean ± SD 908 ± 590 vs 955 ± 551 m for the remaining patients; ANOVA:  $F_{(1, 99)} = 0.058, P = 0.810$ ) or body weight before the start of treatment (79.5 ± 18.7 vs 75.4 ± 19.5 kg for the remaining patients; ANOVA:  $F_{(1, 105)} = 1.313, P = 0.26$ ).

Overall, 38% of the patients (56% of the IS-VL patients, 18% of the HIV-VL and 37% of the IC-VL patients) fulfilled the criteria for HLH (Table 3). Table 4 shows the results for the HLH criteria assessed.

**Diagnosis**

Table 5 shows the results of the diagnostic tests. Before the introduction of the RDT (rK39-ICT) test, the median delay in diagnosis was 30 days (IQR: 18.5–82.5). After the introduction of the test it decreased to a median of 16 days (IQR: 10–28) (Kruskal–Wallis H-test:  $\chi^2 = 5.094, df = 1, P = 0.024$ ).

**Treatment and outcome**

Three patients with IC-VL were not treated, two with IC-VL were lost to follow-up, and one died due to complications of advanced cirrhosis before starting treatment. A total of 108 patients therefore received treatment, 104 with liposomal amphotericin B (LAB) and four with amphotericin B lipid complex (LABC) (doses shown in Table 6). All HIV-VL patients received HAART and secondary prophylaxis for VL after their VL diagnosis.

An increase in creatinine of ≥ 0.5 mg/dl over baseline was observed in 35 patients (32%), but was reversible in all cases. Chills were recorded in 10 patients (9%). No significant differences in adverse effects were seen between the patient groups.

**Table 1** Baseline characteristics of the patients with HIV (HIV-VL) at the time of VL diagnosis

Sex, age (years)	HIV risk factor <sup>a</sup>	Origin	Time between HIV and VL diagnoses	HCV co-infection	CD4	Viral load <sup>b</sup>	HAART
Male, 48	PDU	Spain	27 years	HCV	99	348,063	No
Male, 46	PDU	Spain	20 years	HCV	4	563,499	No
Male, 34	Hetero	Peru	3 years	No	29	288,439	No
Female, 45	Hetero	Eq. Guinea	4 years	No	305	< 20	TDF/FTC/EFV
Male, 48	PDU	Spain	16 years	HCV	46	660,099	No
Male, 37	Hetero	Nigeria	3 months	No	322	21,511	No
Female, 21	Vertical	Eq. Guinea	21 years	No	16	60,600	No
Male, 32	Hetero	Romania	20 days	No	59	143,400	No
Male, 36	Hetero	Nigeria	6 days	No	4	1,169,645	No
Male, 39	MSM	Poland	5 months	No	48	149,661	No
Male, 33	MSM	Moldova	2 days	No	40	1,610,000	No

<sup>a</sup> How the patients became infected by HIV

<sup>b</sup> Number of RNA viral copies/ml at the moment of VL diagnosis

Abbreviations: PDU, parenteral drug user; MSM, men who have sex with men; Hetero, heterosexual; CD4, number of CD4 cells/mm<sup>3</sup> at the moment of VL diagnosis; HAART, highly active antiretroviral therapy; HCV, hepatitis C virus; TDF/FTC/EFV, tenofovir/emtricitabine/efavirenz

**Table 2** Characteristics of the immunosuppressed patients (IS-VL) at the time of VL diagnosis

Sex, age (years)	Underlying disease	Origin	Time between starting immunosuppression and VL diagnosis	Corticosteroids (CE) <sup>a</sup>	Methotrexate	Anti-TNF	Others
Female, 68	RA	Spain	> 1 year	CE, low	Methotrexate	No	No
Male, 50	IBD	Spain	4 months	CE, intermediate	No	No	No
Male, 88	COPD	Spain	> 1 year	CE, high	No	No	No
Male, 64	Psoriatic arthritis	Spain	> 1 year	No	Methotrexate	No	No
Male, 40	UIP	Spain	> 1 year	CE, intermediate	No	No	Azathioprine
Female, 54	RA	Spain	> 1 year	CE, intermediate	Methotrexate	Etanercept	No
Female, 69	RA	Cuba	4 months	CE, intermediate	Methotrexate	No	No
Male, 54	Psoriatic arthritis	Spain	Mtx > 1 year, Eta 10 months	CE, low	Methotrexate	Etanercept	No
Male, 65	COPD	Spain	> 1 year	CE, high	No	No	No
Female, 44	IBD	Spain	> 1 year	No	No	Infliximab	Azathioprine
Female, 60	RA	Spain	> 1 year	No	Methotrexate	No	IL-20
Female, 47	IBD	Spain	16 months	No	No	Adalimumab	No
Female, 44	Psoriasis	Spain	> 1 year	No	Methotrexate	No	No
Male, 72	Giant-cell arteritis	Spain	> 1 year	CE, high	No	No	No
Male, 33	Tubulo-interstitial nephritis	Nigeria	5 months	CE, high	No	No	No
Male, 30	IgA nephropathy	Spain	> 1 year	CE, low	No	No	No

<sup>a</sup> CE doses (prednisone equivalent): low dose, below 5 mg/day; intermediate dose, 5–10 mg/day; high dose, above 30 mg/day

**Abbreviations:** RA, rheumatoid arthritis; IBD, inflammatory bowel disease; COPD, chronic obstructive pulmonary disorder; UIP, usual interstitial pneumonia; CE, corticosteroids; IL-20, monoclonal antibody anti-IL-20

All but one patient met the initial response criteria (99%). The median follow-up of all treated patients was 316 weeks (IQR: 216–370), with no significant differences with respect to immunological status. Fourteen treatment failures (12.9%) were noted, 13 relapses (12%) and one lack of initial response (0.9%) (Table 6). Only four of the 14 patients who failed met the criteria for HLH (29%). No association was seen between meeting the criteria for HLH and relapse ( $P = 0.315$ ). Table 7 shows the detailed characteristics of the eight IC-VL patients who relapsed.

Multivariate analysis identified treatment failure and relapse to be associated with doses of <21 mg/kg in IC-VL patients (OR: 14.7; 95% CI: 2.6–83.3;  $P = 0.002$ ) and non-compliance with prophylaxis in HIV-VL (OR: 7.2; 95% CI: 1.5–34.2;  $P = 0.013$ ).

## Discussion

### Clinical features

The epidemiological characteristics of patients with VL in Fuenlabrada have undergone no substantial changes since the outbreak was declared ten years ago [2]. The present sample is dominated by males, as is the case for most VL case series [13–16], and contains patients of all ages (up to 95 years), as might be expected from data for epidemic outbreaks in non-endemic areas. In previous IC-VL series, male children dominated the sample, both in Spain [17] and in Italy [13, 18–20]. These Italian series

from more than 20 years ago still form the basis of current treatment guidelines for VL, including for adults, in the Mediterranean area. In the present outbreak, the patients with IS-VL were older. A disproportionately high number of sub-Saharan immigrants with VL has been recorded since the beginning of the outbreak, despite the fact that the foreign population makes up only 13% of Fuenlabrada's population [2], perhaps due to genetic factors [6]. The present results suggest that they were not infected in their countries of origin, and no differences were seen between them and the remaining patients in terms of the distance they lived from the focus of the outbreak.

Fever, splenomegaly and pancytopenia are the main clinical criteria of VL [3, 7], and affected >90% of the patients in the present study. For many, cough, headache (in 30%), vomiting and abdominal pain were recorded, non-specific symptoms that hinder making a differential diagnosis. Certainly, thrombocytopenia, splenomegaly and non-specific focalizing symptoms can be confused with viral syndromes, or malaria in the case of sub-Saharan patients, or immunosuppressant-induced pancytopenia in the case of IS-VL patients. In areas where VL is little expected, diagnosis can become difficult, as revealed by the high median diagnostic delay in the first years of the outbreak.

Fever and plasma ferritin were the only clinical features that were less frequent in patients with HIV-VL. A lower

**Table 3** Clinical characteristics according to immunological status

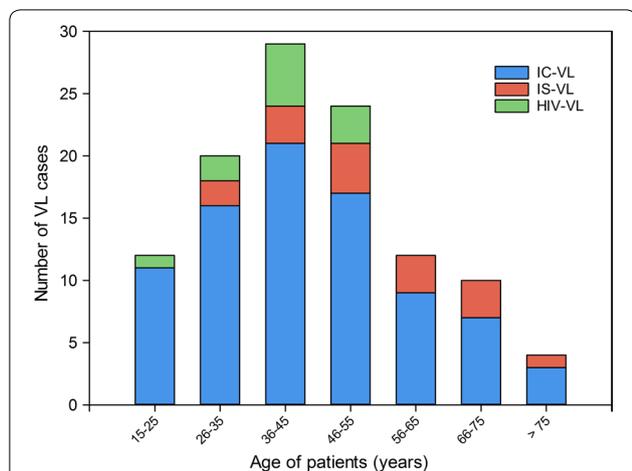
	IC-VL (n = 84)	HIV-VL (n = 11)	IS-VL (n = 16)	Total VL (n = 111)	P-value
Male (%)	73	82	56	71	0.297
Age (mean ± SD, years)	44.0 ± 16.5	38.2 ± 8.0	54.8 ± 16.0	45.0 ± 16.9	ANOVA: $F_{(2, 110)} = 6.22, P = 0.017^*$
Immigrants (%)	58	73	13	53	$\chi^2 = 13.22, df = 2, P = 0.001^*$
Sub-Saharan origin (%)	54	36	13	46	$\chi^2 = 9.58, df = 2, P = 0.008^*$
Diabetes (%)	16	9	13	14	0.828
Distance to park (mean ± SD, m)	922 ± 566	928 ± 701	917 ± 544	921 ± 569	0.999
Delay of diagnosis <sup>a</sup> (median (IQR), days)	18.5 (14–30)	21 (16–60)	24 (10–60)	20 (13–30)	0.640
Fever (%)	98	73	94	95	$\chi^2 = 11.81, df = 2, P = 0.003^*$
Asthenia (%)	49	46	69	51	0.315
Weight loss (%)	40	36	31	39	0.786
Anorexia (%)	33	36	25	32	0.784
Cough (%)	31	36	31	32	0.836
Cephalaea (%)	35	9	19	30	0.113
Vomiting (%)	21	9	0	16	0.056
Abdominal pain (%)	15	18	12	15	0.762
Odynophagia (%)	10	9	6	9	0.906
Diarrhoea (%)	6	18	13	8	0.314
Dyspnoea (%)	7	9	0	6	0.512
Weight (mean ± SD, kg)	78.5 ± 19.1	68.3 ± 18.0	76.4 ± 20.1	77.1 ± 19.2	0.254
Clinical splenomegaly (%)	29	46	31	31	0.537
Radiological splenomegaly, n/T (%)	75/79 (95)	10/11 (91)	13/15 (87)	93	0.472
Spleen size (mean ± SD, cm)	15.7 ± 2.0	15.9 ± 2.1	15.2 ± 2.32	15.7 ± 2.0	0.627
Anaemia (haemoglobin < 12 mg/dl) (%)	87	82	94	87	0.599
Haemoglobin (mean ± SD, mg/dl)	10.2 ± 1.7	10.9 ± 1.3	9.4 ± 1.5	10.2 ± 1.7	ANOVA: $F_{(2, 106)} = 3.24, P = 0.043^*$
Leukopenia (< 4000/mm <sup>3</sup> ) (%)	90	82	94	90	0.587
Leucocytes (mean ± SD, mm <sup>3</sup> )	2715 ± 902	2513 ± 1208	2470 ± 1083	2658 ± 958	0.565
Thrombocytopenia (< 150,000/mm <sup>3</sup> ) (%)	93	91	100	94	0.512
Platelets (mean ± SD, mm <sup>3</sup> )	93,379 ± 41,771	103,364 ± 38,263	77,875 ± 29,132	92,111 ± 40,077	0.228
CRP (mean ± SD, mg/dl)	12.2 ± 7.3	8.3 ± 6.8	9.2 ± 6.9	11.3 ± 7.3	0.112
CRP > 10 mg/dl	56	36	38	51	0.225
Ferritin (median (IQR), ng/ml)	2264 (914–6368.5)	712 (469–1098.5)	1854 (1146–5369)	1969 (838–5784)	Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 6.31, df = 2, P = 0.043^*$
Ferritin > 1000 ng/ml, n/T (%)	56/73 (77)	1/6 (17)	11/14 (79)	68/93 (73)	$\chi^2 = 11.81, df = 2, P = 0.005^*$
ESR, n/T (mean ± SD, mm/h)	25/44 (73 ± 32)	3/6 (73 ± 26)	2/11 (60 ± 35)	30/61 (71 ± 32)	0.494
ESR > 70 mm/h, n/T (%)	25/44 (57)	3/6 (50)	2/11 (18)	30/61 (49)	0.072
Triglycerides (mean ± SD, mg/dl)	220 ± 81	170 ± 66	203 ± 64	211 ± 78	0.124
HLH <sup>b</sup> , n (%)	31 (37)	2 (18)	9 (56)	42 (38)	0.129
Auto-antibody positive, n/T (%)	13/44 (30)	2/4 (50)	3/14 (21)	18/62 (29)	0.535
Serology infectious diseases <sup>c</sup> positives, n/T (%)	25/55 (46)	1/6 (17)	5/10 (50)	31/71 (44)	0.366

<sup>a</sup> Time in days from when patient noticed symptoms to diagnosis

<sup>b</sup> HLH criteria are shown in Table 4

<sup>c</sup> IgG positive for other infectious diseases: *Borrelia burgdorferi* 11, *Coxiella burnetii* 10, *Parvovirus* 6, *Mycoplasma* 4, *Chlamydomphila* 4, *Rickettsia* 4, Syphilis RPR 2  
 Abbreviations: n, sample size for each group; IC-VL, visceral leishmaniasis in immunocompetent patients; HIV-VL, visceral leishmaniasis in patients with HIV; IS-VL, visceral leishmaniasis in immunosuppressed patients (receiving steroids, methotrexate, anti-TNF), SD, standard deviation; IR, interquartile range; n/T, number of positives/total number tested; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HLH: haemophagocytic lymphohistiocytosis

\* $P < 0.05$



**Fig. 2** Age distribution of VL patients during the outbreak. Abbreviations: IC-VL, visceral leishmaniasis in immunocompetent patients; HIV-VL, visceral leishmaniasis in patients with HIV; IS-VL, visceral leishmaniasis in immunosuppressed patients (receiving steroids, methotrexate, anti-TNF)

proportion of patients with fever has been described in transplanted patients with VL [21]. This has been related to the incapacity of the humoral immune system to act

against the parasite. However, the clinical presentation of disease was similar across the three patient groups. Some atypical forms, such as mucosal leishmaniasis and asymptomatic carriers, can be more common in patients co-infected with HIV, but in our experience the clinical presentation of HIV-VL was similar, in most cases, to that of IC-VL [11].

A large number of patients met the criteria for HLH, a syndrome associated with very high mortality [12]. However, no higher mortality nor risk of relapse was seen in the present work; indeed, the response to treatment for VL was good. In the Fuenlabrada setting, VL needs to be ruled out in all cases of HLH given its prognostic implications [22]. In the IC-VL and IS-VL patients, plasma ferritin was notably elevated; indeed, such concentrations are associated with very few diseases and in the present context can be taken as a relatively specific sign of VL.

A high percentage (30%) of patients were positive for auto-antibodies (commonly found in patients with VL) and for antibodies to other infectious agents (especially *Borrelia* and *Coxiella*) (45%). VL can therefore be initially confused with autoimmune disease [23], and certainly the cross-reactivity of these auto-antibodies with the histone protein of *Leishmania* [24] has been described. Thus, patients with autoimmune disease but without VL may

**Table 4** HLH criteria assessed

	IC-VL (n = 84)	HIV-VL (n = 11)	IS-VL (n = 16)	Total (n = 111)	P-value
Fever (%)	98	73	94	95	$\chi^2 = 11.81, df = 2, P = 0.003^*$
Radiological splenomegaly (%)	95	91	87	93	0.472
Cytopenia (at least 2 blood cell lines) (%)	94	91	94	94	0.930
Hypertriglyceridemia (> 265 mg/dl) (%)	23	9	25	22	0.552
Hemophagocytosis in bone marrow (%)	50	22	75	52	$\chi^2 = 6.69, df = 2, P = 0.035^*$
Ferritin > 500 mg/l (%)	86	78	93	86	0.551

Abbreviations: n, sample size for each group; IC-VL, visceral leishmaniasis in immunocompetent patients; HIV-VL, visceral leishmaniasis in patients with HIV; IS-VL, visceral leishmaniasis in immunosuppressed patients (receiving steroids, methotrexate, anti-TNF)

\*P < 0.05

**Table 5** Diagnostic test results

	IC-VL (n = 84)	HIV-VL (n = 11)	IS-VL (n = 16)	Total (n = 111)	P-value
RDT (rk39-ICT) (n/T, %)	26/62 (42)	5/10 (50)	7/12 (58)	38/84 (45)	0.550
ELISA/iIFAT (n/T, %)	77/81 (95)	11/11 (100)	16/16 (100)	104/108 (96)	0.500
Optical microscopy (bone marrow) (n/T, %)	32/78 (41)	5/10 (50)	8/16 (50)	45/104 (43)	0.726
Culture (bone marrow) (n/T, %)	6/28 (21)	3/3 (100)	3/6 (43)	12/37 (32)	$\chi^2 = 8.64, df = 2, p = 0.013^*$
PCR (bone marrow) (n/T, %)	67/73 (92)	9/10 (90)	16/16 (100)	92/99 (93)	0.474
PCR (blood) (n/T, %)	21/25 (84)	4/4 (100)	7/8 (88)	32/37 (87)	0.682

Abbreviations: RDT (rk39-ICT), rapid diagnostic test, immunochromatographic test based on rk39 antigen; n, sample size for each group; IC-VL, visceral leishmaniasis in immunocompetent patients; HIV-VL, visceral leishmaniasis in patients with HIV; IS-VL, visceral leishmaniasis in immunosuppressed patients (receiving steroids, methotrexate, anti-TNF); n/T, number of positives/total number of tests performed

**Table 6** Dose and clinical outcome in patients with VL according to their immunological status

LAB dose <sup>a</sup> (mg/kg)	VL treated (n = 108)	Relapses (n = 14, 13.0%)
IC-VL <sup>b</sup>	81	8 (9.9%)
15	2	1 (50.0%)
18	5	3 (60.0%)
21	63 LAB + 2 ABCL	3 (4.6%)
30	5 LAB + 1 ABCL	1 (16.7%) <sup>c</sup>
HIV-VL	11	3 (27.3%)
21	1	1 (100%) <sup>d</sup>
30	4	2 (50.0%) <sup>e</sup>
40	6	0
IS-VL	16	3 (18.8%)
21	3 LAB + 1 ABCL	1 (25.0%) <sup>f</sup>
30	4	1 (25.0%) <sup>c</sup>
40	8	1 (12.5%)

<sup>a</sup> Usual LAB standard dose (see text): IC-VL 18–21 mg/kg; HIV-VL 30–40 mg/kg; IS-VL 21–40 mg/kg

<sup>b</sup> 3 IC-VL patients with solid neoplasms were treated with 21, 30 and 40 mg/dl each, with no relapses

<sup>c</sup> Relapsed and died during retreatment

<sup>d</sup> This patient was clinically cured after treatment but voluntarily stopped secondary prophylaxis and relapsed

<sup>e</sup> One patient was clinically cured after treatment but voluntarily stopped secondary prophylaxis and relapsed

<sup>f</sup> Lack of initial response, cured after retreatment

**Abbreviations:** LAB, liposomal B amphotericin; ABCL, amphotericin B lipid complex; IC-VL, visceral leishmaniasis in immunocompetent patients; HIV-VL, visceral leishmaniasis in patients with HIV; IS-VL, visceral leishmaniasis in immunosuppressed patients (receiving steroids, methotrexate, anti-TNF)

test positive for *Leishmania* serology in ELISA. Indeed, four of the present patients had false positive serology results but did not meet the case definition criteria.

## Diagnosis

RDT based on rK39 was introduced during the outbreak as a first step test in the diagnosis of VL. Combining the RDT test with conventional testing is now recommended in the WHO European guidelines 2017 [3], but this was not the case in 2010 [7]. Although RDT has been reported as a sensitive and specific test (> 90% for both), the results returned have been highly variable by region [10]. The two studies performed in Europe reported sensitivities of between 52 and 100% [25, 26]. Its reliability for detecting *L. infantum* in Europe is therefore not clear. RDT (rK39-ICT) returned positive results for only 50% of patients with actual VL, although it had a positive predictive value (PPV) of 99%. Thus, a negative test cannot rule out VL, but a positive test for a patient in whom VL is clinically suspected is almost confirmatory. Conventional iFAT and ELISA returned positive results for 96% of patients with VL, but at least 13 patients had false positive results (PPV 89%). This loss of specificity is not surprising in the context of an epidemic in which there may be many asymptomatic patients exposed to *Leishmania* who return a positive serological test. Thus, according to the present results, a patient with suspected VL who returned both positive RDT (rK39-ICT) and ELISA/iFAT tests (regardless of the antibody titre) could be treated without the need for any additional test, while another disease should be sought in a patient returning two negative results. The WHO guidelines recommend that, where there is disagreement, a parasitological test is advisable, but in our experience this disagreement always involves a negative RDT (rK39-ICT) and a positive ELISA/iFAT test.

No serological differences were detected between the IC-VL, IS-VL and HIV-VL patients. Based on older series, serological results are usually understood to be the least reliable for diagnostic purposes in patients with HIV-VL [11]. However, a recent meta-analysis detected

**Table 7** Clinical features of IC-VL patients who relapsed

Sex, age (years)	Origin	Sub-Saharan <sup>a</sup>	Days to relapse	Drug	Dose (mg/kg)	Retreatment dose (mg/kg)	Status 6 months after retreatment
Male, 38	Spain	No	270	LAB	15	35	Cured
Male, 95	Spain	No	30	LAB	18	30	Cured
Male, 15	Spain	Yes	60	LAB	18	30	Cured
Female, 37	Eq. Guinea	Yes	115	LAB	18	21	Cured
Female, 64	Eq. Guinea	Yes	97	ABCL	21	30 (LAB)	Cured
Male, 34	Eq. Guinea	Yes	165	LAB	21	20 (LAB + miltefosine)	Cured
Male, 39	Nigeria	Yes	71	LAB	21	40	Cured
Male, 51	Spain	No	190	LAB	30	12 (exitus cirrhosis)	Exitus

<sup>a</sup> Relapses in persons of sub-Saharan origin with IC-VL: 11.9% (5/42) vs 7.9% (3/38),  $P = 0.414$

**Abbreviations:** LAB, liposomal B amphotericin; ABCL, amphotericin B lipid complex

better results for the most current series [27]. This might be explained in that these older series involved patients who were infected *via* the sharing of needles. Only three of the present HIV-VL patients acquired HIV *via* the parenteral route, and even in these patients, HIV was diagnosed at least 16 years before VL. It is therefore likely that all were infected *via* the normal vector. To examine this further, clinical and epidemiological data should be included in future studies on the serology of HIV-VL patients.

### Treatment and outcome

The treatment of choice for *L. infantum*-induced IC-VL is LAB (18–21 mg/kg total), but the recommendation level is low [3, 8]; no double-blind randomised studies comparing different treatment regimens have been undertaken, the case series on which this treatment choice is based are >20 years old, and the data extracted from them refer largely to Italian children [13, 18, 19, 28]. In one of these studies, 15 mg/kg LAB cured 90% of the patients [13]. Given the renal toxicity of this drug, two of the present IC-VL patients were treated with 15 mg/kg. A cure rate of 100% was hoped for, but one patient relapsed. In addition, five IC-VL patients were treated with a dose of 18 mg/kg, as recommended by current guidelines [7], and three of these (60%) relapsed. Thus, an unexpectedly high relapse rate was observed with the <21 mg/kg dose, which was in fact the only factor associated with relapse in the IC-VL patients. One might hypothesise about the virulence of the strain [29] or whether there are higher relapse rates among sub-Saharan patients, but the differences are not statistically significant. In our routine practice we strongly recommend the use of the standard regimen approved by the FDA for adults, i.e. 3 mg/kg/day on days 1–5, 14 and 21 in adults with IC-VL [8], avoiding other regimens and doses based on results obtained in children [13, 20].

Some guidelines recommended that patients with IC-VL should be followed up for 6–12 months [7, 8]. During the outbreak, two of our patients (25%) relapsed after six months; it would therefore seem sensible to monitor patients for up to 12 months [3].

Only three patients with active VL died during the outbreak: one IS-VL and two IC-VL patients. The latter two had severe chronic liver disease and were in a pre-transplant situation; the main cause of their deaths was deemed to be liver disease. However, the patients who also had cancer responded well, with no relapses.

Most guidelines recommend a higher dose of LAB (40 mg/kg) for patients co-infected with *Leishmania* and HIV, but the level of evidence for this is very low [3, 8].

A 30 mg/kg dose has also been recommended [7]. These recommendations were initially based on two case series, one of ten patients [30] and one of five patients [31], collated during the pre-HAART era. In both studies the initial response was good, but the percentage of relapses was high since secondary prophylaxis was not provided [32]. Although later, non-randomized studies that included HAART and secondary prophylaxis with LAB endorsed this strategy [33], the dose has not been re-evaluated despite some case series studies reporting an initial response with 15 mg/kg [34], 22 mg/kg [35] and 30 mg/kg [18]. The present HIV-VL patients had a good initial response to both the 30 and 40 mg/kg doses, so these lower doses seem appropriate. With current HAART, patients may certainly require less than 30 mg/kg, and secondary prophylaxis could likely be safely avoided in selected patients [36]. Multicentre trials to investigate the treatment of HIV-VL have been called for in different reviews [9, 33].

Finally, the IS-VL patients formed a heterogeneous group. It has been reported that steroids, methotrexate and anti-TNF drugs may favour the appearance of VL (these patients are considered immunosuppressed) [9, 37, 38]. Current recommendations suggest they should be managed in a manner similar to IC-VL patients, but this is based on evidence provided by individual cases [3, 8, 9]. The present IS-VL patients responded similarly to doses of 21 and 40 mg/kg LAB, and no factor associated with the few relapses recorded could be identified. More information on the treatment of such patients is required.

The main limitation of this work is its observational nature. For any conclusions to be drawn regarding the diagnostic tests performed or different treatment regimens tried, comparative clinical trials would need to be performed. In addition, the data were collected during an epidemic outbreak, and the sample excludes children and the recipients of solid organ transplants (to whose populations the results cannot be extrapolated).

### Conclusions

IS-VL was more frequent than HIV-VL; the lack of experience in dealing with IS-VL is a challenge that needs to be met. Given the present setting, it was deemed always appropriate to consider VL in the differential diagnosis of fever, splenomegaly, pancytopenia and very high plasma ferritin. The clinical features of the patients in each group were similar, although HIV-VL patients had less fever and lower plasma ferritin. RDT (rK39-ICT) was found to be highly specific as a diagnostic test, but much less sensitive than reported in other scenarios; however, a combination of positive RDT and ELISA or iFAT tests

is enough to warrant the start of treatment. The serology of HIV-VL, IS-VL and IC-VL patients was similar. Current guidelines for treatment seem appropriate, but the doses of LAB required to treat patients with HIV-VL and IS-VL are poorly defined; more information is needed. The standard regimen of LAB (3 mg/kg/day on days 1–5, 14 and 21) seems appropriate for the treatment of adults with IC-VL, but not lower doses. Developing methods to help predict relapse would be very useful.

#### Abbreviations

VL: visceral leishmaniasis in immunocompetent adults; IC-VL: visceral leishmaniasis in immunocompetent adults; HIV-VL: visceral leishmaniasis in patients with HIV; IS-VL: visceral leishmaniasis in patients receiving immunosuppressants; RDT (rK39-ICT): rapid diagnostic test, immunochromatographic test based on rK39 antigen; LAB: liposomal amphotericin B; HAART: highly active antiretroviral therapy; HUF: Hospital Universitario de Fuenlabrada; HLH: haemophagocytic lymphohistiocytosis.

#### Acknowledgements

The authors thank the patients who participated in this study. This manuscript presents results included in the doctoral thesis of LH.

#### Authors' contributions

LH, AC and BM collected, analyzed and interpreted IC-VL patient data, and made major contributions to the writing of the manuscript. LM, JG-M, JJ and IG-A performed the serological tests. EC and JM interpreted patient data and made major contributions to the writing of the discussion section. JMR-G designed the study and analyzed and interpreted the overall VL data. JSM collected, analyzed and interpreted patient data and made a major contribution to the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

This work received financial support from the Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) (RD12/0018/0008; RD16/0027/0017) (ISCIII) and the FEDER.

#### Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are included within the article. The datasets used and/or analyzed during the present study are available from the corresponding author upon request.

#### Ethics approval and consent to participate

All patients consented to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee (APR 12-67) of the Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup> Área de Infecciosas, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Camino del Molino 2, 28942 Fuenlabrada, Madrid, Spain. <sup>2</sup> Universidad Rey Juan Carlos, Avda. Atenas s/n, 28922 Alcorcón, Madrid, Spain. <sup>3</sup> Área de Microbiología, Servicio de Laboratorio Clínico, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Camino del Molino 2, 28942 Fuenlabrada, Madrid, Spain. <sup>4</sup> Centro Nacional de Microbiología, WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Majadahonda, Madrid, Spain.

Received: 20 March 2019 Accepted: 19 July 2019  
Published online: 24 July 2019

#### References

- Dirección General de Salud Pública. Leishmaniasis en la Comunidad de Madrid, 2015. <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017837.pdf>. Accessed 16 Dec 2018.
- Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013;18:20546.
- WHO/Regional Office for Europe. Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region. 2017. <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/978-92-89052-51-1/en/>. Accessed 22 Apr 2018.
- 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;190:268–71.
- Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013;18:20545.
- Horrillo L, San Martín JV, Molina L, Madroñal E, Matía B, Castro A, et al. Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:269–73.
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf;jsessionid=92DC989D367A1E7AD2FA0A7E8A56FB90?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=92DC989D367A1E7AD2FA0A7E8A56FB90?sequence=1). Accessed 22 Apr 2018.
- 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). *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96:24–45.
- van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:286–99.
- Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;6:CD009135.
- 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;21:334–59.
- Henter J-I, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48:124–31.
- Davidson RN, Di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Gaeta GB, Pempinello R, et al. Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). *Clin Infect Dis*. 1996;22:938–43.
- Leta S, Dao THT, Mesele F, Alemayehu G. Visceral leishmaniasis in Ethiopia: an evolving disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3131.
- Reis LLD, Balieiro AAS, Fonseca FR, Gonçalves MJF. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50:638–45.
- Sinha PK, van Griensven J, Pandey K, Kumar N, Verma N, Mahajan R, et al. Liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients: 2-year treatment outcomes in Bihar, India. *Clin Infect Dis*. 2011;53:e91–8.
- Ramos JM, Clavijo A, Moral L, Gavilan C, Salvador T, González de Dios J. Epidemiological and clinical features of visceral leishmaniasis in children in Alicante Province, Spain. *Paediatr Int Child Health*. 2018;38:203–8.
- Davidson RN, Di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Russo R, Gaeta GB, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q J Med*. 1994;87:75–81.
- Syriopoulou V, Daikos GL, Theodoridou M, Pavlopoulou I, Manolaki AG, Sereti E, et al. Two doses of a lipid formulation of amphotericin B for the treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2003;36:560–6.
- Cascio A. A 6 day course of liposomal amphotericin B in the treatment of infantile visceral leishmaniasis: the Italian experience. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:217–20.
- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:191–9.

22. Hernández-Jiménez P, Díaz-Pedroche C, Laureiro J, Madrid O, Martín E, Lumberras C. Linfocitosis hemofagocítica: análisis de 18 casos. *Med Clin*. 2016;147:495–8.
23. Ortiz M, Mon C, Herrero JC, Olié A, Rodríguez I, Ortega O, et al. Glomerulonephritis and cryoglobulinemia: first manifestation of visceral leishmaniasis. *Clin Nephrol*. 2015;83:370–7.
24. Lakhali S, Benabid M, Sghaier IB, Bettaieb J, Bouratbine A, Galai Y. The sera from adult patients with suggestive signs of autoimmune diseases present antinuclear autoantibodies that cross-react with *Leishmania infantum* conserved proteins: crude *Leishmania* histone and soluble *Leishmania* antigens [corrected]. *Immunol Res*. 2015;61:154–9.
25. Brandonisio O, Fumarola L, Maggi P, Cavaliere R, Spinelli R, Pastore G. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:461–4.
26. Varani S, Ortalli M, Attard L, Vanino E, Gaibani P, Vocale C, et al. Serological and molecular tools to diagnose visceral leishmaniasis: 2-years' experience of a single center in Northern Italy. *PLoS ONE*. 2017;12:e0183699.
27. Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1665.
28. di Martino L, Davidson RN, Giacchino R, Scotti S, Raimondi F, Castagnola E, et al. Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin B. *J Pediatr*. 1997;131:271–7.
29. 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;7:499.
30. Russo R, Nigro LC, Minniti S, Montineri A, Gradoni L, Caldeira L, et al. Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *J Infect*. 1996;32:133–7.
31. Laguna F, Torre-Cisneros J, Moreno V, Villanueva JL, Valencia E. Efficacy of intermittent liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 1995;21:711–2.
32. Sundar S, Chakravarty J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. *J Glob Infect Dis*. 2010;2:159–66.
33. Molina I, Falcó V, Crespo M, Riera C, Ribera E, Curran A, et al. Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60:837–42.
34. Lebrato JC, García ET, Quero JH, Escobar T. Tratamiento de la coinfección VIH-leishmaniasis visceral con un nuevo régimen de anfotericina B liposomal (AMB-L). *Med Clin*. 2001;116:395.
35. Torre-Cisneros J, Villanueva JL, Kindelan JM, Jurado R, Sanchez-Guijo P. Successful treatment of antimony-resistant visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 1993;17:625–7.
36. Castro A, Carrillo E, San Martín JV, Botana L, Molina L, Matía B, et al. Lymphoproliferative response after stimulation with soluble *Leishmania* antigen (SLA) as a predictor of visceral leishmaniasis (VL) relapse in HIV+ patients. *Acta Trop*. 2016;164:345–51.
37. Zanger P, Kötter I, Kreamsner PG, Gabrysich S. Tumor necrosis factor alpha antagonist drugs and leishmaniasis in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:670–6.
38. Pagliano P, Ascione T, Di Flumeri G, Boccia G, De Caro F. Visceral leishmaniasis in immunocompromised: diagnostic and therapeutic approach and evaluation of the recently released IDSA guidelines. *Infez Med*. 2016;24:265–71.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)

