



TESIS DOCTORAL

Alteraciones en médula ósea, sangre y bioquímica sérica en pacientes con Leishmaniasis visceral

Autor:

Alfredo Bermejo Rodríguez

Director:

José Manuel Ruiz Giardín

Tutor:

Juan Antonio García Velasco

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de Doctorado

2019



TESIS DOCTORAL

Alteraciones en médula ósea, sangre y bioquímica sérica en pacientes con Leishmaniasis visceral

Autor:

Alfredo Bermejo Rodríguez

Director:

José Manuel Ruiz Giardín

Tutor:

Juan Antonio García Velasco

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de Doctorado

2019

“Por medio de los microscopios
Los microbios
Observan a los sabios”

Suenan timbres

Luis Vidales (1904-1990), poeta colombiano.

AGRADECIMIENTOS

A Ángela y a Alfredo, que han contribuido desde siempre a mi progreso intelectual y como persona, y que se sentirán profundamente orgullosos de la finalización de esta tesis doctoral.

A Maite, Irene y Alejandro, que han aguantado y cubierto todos los vacíos dejados por mis horas de trabajo, sobre todo en casa.

A Chema, que con su sabia orientación y ánimo tanto ha contribuido a la finalización de este trabajo.

A Stefan, que con su conocimiento estadístico ha conseguido objetivar en ciencia mis intuiciones.

A todos los compañeros del Hospital Universitario de Fuenlabrada y de otros hospitales que han contribuido a la realización de esta tesis con su trabajo o sus consejos.

ÍNDICE

1. <u>Resumen</u>	<u>15</u>
1.1. <u>Antecedentes</u>	<u>15</u>
1.2. <u>Metodología</u>	<u>15</u>
1.3. <u>Resultados</u>	<u>16</u>
1.4. <u>Conclusión</u>	<u>18</u>
2. <u>Introducción</u>	<u>19</u>
2.1. <u>Término Leishmaniasis y palabras clave</u>	<u>19</u>
2.1.1. <u>Terminología</u>	<u>19</u>
2.1.2. <u>Palabras clave</u>	<u>19</u>
2.2. <u>Historia de la leishmaniasis</u>	<u>20</u>
2.3. <u>Epidemiología y distribución mundial de la leishmaniasis</u>	<u>28</u>
2.4. <u>Descripción del parásito, vector y reservorio de la leishmaniasis</u>	<u>35</u>
2.4.1. <u>Descripción del parásito y su ciclo</u>	<u>35</u>
2.4.2. <u>Vector</u>	<u>37</u>
2.4.3. <u>Reservorio</u>	<u>40</u>
2.5. <u>Brote de leishmaniasis en la Comunidad de Madrid (2009-2014)</u>	<u>41</u>
2.6. <u>Patogenia de la leishmaniasis</u>	<u>48</u>
2.7. <u>Manifestaciones clínicas de la infección por <i>Leishmania</i></u>	<u>54</u>
2.7.1. <u>Clínica de la Leishmaniasis Visceral</u>	<u>54</u>
2.8. <u>Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral</u>	<u>57</u>
2.8.1. <u>Métodos parasitológicos</u>	<u>57</u>
2.8.2. <u>Métodos serológicos</u>	<u>59</u>

2.8.3.	<u>Métodos moleculares</u>	<u>61</u>
2.8.4.	<u>Aproximación diagnóstica</u>	<u>62</u>
2.8.5.	<u>Diagnóstico diferencial</u>	<u>62</u>
2.9.	<u>Tratamiento de la Leishmaniasis Visceral</u>	<u>64</u>
2.10.	<u>Modelos diagnósticos predictivos</u>	<u>66</u>
3.	<u>Justificación del estudio</u>	<u>69</u>
4.	<u>Hipótesis de trabajo y objetivos</u>	<u>71</u>
5.	<u>Material y métodos</u>	<u>73</u>
5.1.	<u>Tipo de estudio</u>	<u>73</u>
5.2.	<u>Hospital Universitario de Fuenlabrada y área de salud</u>	<u>73</u>
5.3.	<u>Premisas éticas</u>	<u>74</u>
5.4.	<u>Definiciones y variables de estudio</u>	<u>74</u>
5.4.1.	<u>Definiciones del estudio</u>	<u>74</u>
5.4.2.	<u>Variables del estudio</u>	<u>75</u>
5.5.	<u>Metodología y técnicas de medida</u>	<u>81</u>
5.6.	<u>Ámbito y diseño del estudio</u>	<u>83</u>
5.7.	<u>Criterios de exclusión</u>	<u>87</u>
5.8.	<u>Recogida de datos y análisis estadístico</u>	<u>88</u>
5.8.1.	<u>Recogida de datos</u>	<u>88</u>
5.8.2.	<u>Análisis estadístico descriptivo y comparativo</u>	<u>88</u>
5.8.3.	<u>Desarrollo del modelo predictivo</u>	<u>89</u>
5.8.4.	<u>Validación del modelo predictivo</u>	<u>90</u>
6.	<u>Resultados</u>	<u>93</u>
6.1.	<u>Resultados descriptivos generales</u>	<u>93</u>

6.1.1.	<u>Resultados demográficos y clínicos</u>	94
6.1.1.1.	<u>Grupo Leishmaniasis Visceral</u>	94
6.1.1.2.	<u>Grupo No Leishmaniasis Visceral</u>	94
6.1.1.3.	<u>Grupo Síndrome Mielodisplásico</u>	95
6.1.2.	<u>Resultados diagnósticos microbiológicos</u>	98
6.1.3.	<u>Resultados analíticos</u>	99
6.1.3.1.	<u>Resultados bioquímicos</u>	99
6.1.3.2.	<u>Resultados del hemograma, morfología sanguínea y VSG</u>	104
6.1.3.3.	<u>Resultados en médula ósea</u>	110
6.1.3.4.	<u>Hierro en médula ósea</u>	117
6.2.	<u>Otros resultados descriptivos</u>	120
6.2.1.	<u>Características diferenciales entre los pacientes en los que se observó <i>Leishmania</i> en la médula ósea y los que no se observó</u>	120
6.2.2.	<u>Características de los pacientes inmunodeprimidos con leishmaniasis</u>	121
6.2.3.	<u>Características de los pacientes africanos subsaharianos con leishmaniasis</u>	122
6.2.4.	<u>Características de los pacientes con fenómenos de hemofagocitosis y leishmaniasis</u>	123
6.3.	<u>Desarrollo de un modelo predictivo diagnóstico basado en las alteraciones detectadas en médula ósea</u>	126
6.3.1.	<u>Análisis univariante</u>	127
6.3.2.	<u>Análisis multivariante</u>	128
6.3.3.	<u>Elaboración de un nomograma</u>	130
6.3.4.	<u>Creación de un sistema de puntuación predictivo</u>	131
6.3.5.	<u>Validación interna del modelo por “bootstrap”</u>	139

6.4. <u>Validación externa del modelo</u>	<u>140</u>
6.4.1. <u>Resultados de la validación externa</u>	<u>141</u>
7. <u>Discusión</u>	<u>143</u>
7.1. <u>Valoración de las alteraciones bioquímicas</u>	<u>144</u>
7.2. <u>Valoración de las alteraciones hematimétricas</u>	<u>146</u>
7.3. <u>Valoración de las alteraciones medulares</u>	<u>150</u>
7.4. <u>Valoración de las alteraciones diferenciales de los subgrupos de pacientes con leishmaniasis visceral</u>	<u>152</u>
7.5. <u>Valoración del modelo predictivo diagnóstico de leishmaniasis visceral</u>	<u>158</u>
7.5.1. <u>Integración de los resultados en el proceso diagnóstico de la leishmaniasis visceral</u>	<u>158</u>
7.5.2. <u>Aplicación del modelo predictivo de médula ósea integrado en el proceso diagnóstico y terapéutico en un paciente con fiebre prolongada y sospecha de leishmaniasis visceral</u>	<u>159</u>
7.6. <u>Limitaciones del estudio</u>	<u>163</u>
8. <u>Conclusiones</u>	<u>167</u>
9. <u>Bibliografía</u>	<u>171</u>
10. <u>Anexos</u>	<u>183</u>
10.1. <u>Publicaciones del autor relacionadas con la tesis</u>	<u>183</u>
10.1.1. <u>Artículo principal relacionado con la tesis</u>	<u>183</u>
10.1.2. <u>Otros artículos</u>	<u>183</u>
10.1.3. <u>Comunicaciones a Congresos</u>	<u>183</u>
10.2. <u>Documentos éticos: autorización del Comité ético</u>	<u>185</u>
10.3. <u>Abreviaturas de uso habitual</u>	<u>186</u>

1. RESUMEN

1.1. Antecedentes

La leishmaniasis visceral (LV) es una grave enfermedad protozoaria endémica en diversas áreas, incluida España, donde predomina la especie *Leishmania infantum*. El diagnóstico se realiza habitualmente mediante la observación del parásito en el aspirado de médula ósea, una técnica de diagnóstico segura y rápida, pero con frecuentes falsos negativos. Otros métodos de diagnóstico como los procedimientos serológicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tienen una alta sensibilidad, pero no siempre están disponibles o el resultado se puede retrasar en el tiempo. En el año 2009, comenzó un brote de leishmaniasis visceral en la zona sur de la Comunidad de Madrid, centrado en la localidad de Fuenlabrada; estos pacientes presentaban alteraciones en la sangre y en la médula ósea no habituales en otras patologías, que han sido analizadas en esta Tesis Doctoral con intención de crear un modelo diagnóstico predictivo basado en estas alteraciones para mejorar el diagnóstico precoz de la leishmaniasis visceral.

1.2. Metodología

Se realizó un estudio observacional de todos los pacientes con diagnóstico o sospecha diagnóstica de leishmaniasis visceral, a partir de los datos del hemograma, la bioquímica sanguínea y las características del aspirado de médula ósea, realizados dentro de la práctica clínica habitual, en pacientes mayores de 15 años valorados en el hospital de Fuenlabrada entre los años 2009 y 2014. En los casos de leishmaniasis visceral el diagnóstico fue

confirmado por observación microscópica del parásito en médula ósea, por PCR o por serología. Se compararon los parámetros de estos pacientes con diagnóstico confirmado de leishmaniasis visceral (grupo leishmaniasis visceral) con el grupo de pacientes con sospecha diagnóstica de leishmaniasis visceral finalmente no confirmada (grupo no leishmaniasis visceral), y también con los pacientes diagnosticados de síndrome mielodisplásico, causa más frecuente de citopenias relacionadas con alteración de la médula ósea (grupo de síndrome mielodisplásico).

Dentro del grupo con diagnóstico final confirmado de leishmaniasis visceral se realizaron comparaciones entre distintos subgrupos en función de características como estado de inmunidad, origen geográfico, presencia de hemofagocitosis y si se había observado o no el parásito en la médula ósea.

Posteriormente se elaboró un modelo predictivo diagnóstico multivariante de leishmaniasis visceral, a partir de los hallazgos en médula ósea de los pacientes con diagnóstico final de leishmaniasis visceral en los que el parásito no se había visualizado por microscopía en médula ósea (período 2009-2014). Se realizó una validación interna del modelo por técnicas “bootstrap”, y una validación externa en otro grupo de pacientes, que incluía los pacientes en los que sí se observó el parásito en médula ósea (del mismo período 2009-2014), más todos los pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis visceral durante el período comprendido entre los años 2015 y 2017.

1.3. Resultados

Los parámetros diferenciales significativos en pacientes con leishmaniasis visceral respecto a los pacientes que no tienen leishmaniasis visceral (indicando entre paréntesis los valores medios o medianos del grupo con leishmaniasis visceral) son los siguientes: en la médula ósea, aumento de megacariocitos (4/5) y porcentajes aumentados de células plasmáticas (6.2 %), macrófagos (1.1 %) y serie eritroide (37.5 %), junto con disminución de serie mieloide (42 %) y mayor frecuencia de hemofagocitosis; en los recuentos sanguíneos, disminución de hemoglobina (102 g/L), leucocitos ($2.6 \times 10^9/L$) y plaquetas ($98 \times 10^9/L$); y en bioquímica, aumento de IgG (15.9 g/L), ferritina (2231 $\mu\text{g/L}$), lactato deshidrogenasa (433 U/L), proteína C reactiva (102 mg/L), AST (65.5 U/L) y triglicéridos (2.09 nmol/L). La comparación con los síndromes mielodisplásicos no muestra como parámetros diferenciales ni las series mieloide y eritroide ni la hemoglobina, manteniéndose la diferencia en los otros parámetros.

Detectamos algunas particularidades en la médula ósea de los siguientes grupos de pacientes con leishmaniasis visceral:

1. En los que no se observó el parásito en la médula ósea respecto a los que sí se observó, estos últimos con mayor proporción de plasmáticas y de linfocitos.
2. En los que tenían coinfección con VIH, con mayor proporción de linfocitos y menor de serie eritroide.
3. En los de origen africano subsahariano, con mayor proporción de células plasmáticas y menor de serie mieloide.
4. En los que presentaban hemofagocitosis, con más hipercelularidad, mayor recuento de macrófagos y más hiperplasia megacariocítica. Se confirmó también una elevada frecuencia de linfocitosis hemofagocítica.

El modelo predictivo diagnóstico de leishmaniasis visceral elaborado tiene en cuenta los siguientes parámetros: % de células plasmáticas, % de serie mieloide y cuantificación de megacariocitos en médula ósea, con un área bajo la curva COR de 0.87 (0.78-0.96). La validación interna, con un área bajo la curva COR de 0.85 (0.75-0.95), y la validación externa, con 0.92 (0.82–1.00), indicaron un funcionamiento correcto del modelo.

1.4. Conclusión

En los pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis visceral, cuando el parásito no se observa en el aspirado de médula, y se descarta un síndrome mielodisplásico, los parámetros que pueden ser útiles para discriminar entre pacientes con y sin leishmaniasis visceral son: en la médula ósea, los aumentos de megacariocitos, células plasmáticas, macrófagos y serie eritroide (o en lugar de esta última la disminución de serie mieloide), y la hemofagocitosis; en los recuentos sanguíneos, la disminución de hemoglobina, leucocitos y plaquetas; y en la bioquímica sérica, aumento en suero de IgG, ferritina, LDH, CRP, AST y triglicéridos.

Además, el uso del modelo predictivo diagnóstico de leishmaniasis visceral (basado en la cuantificación de megacariocitos, % de células plasmáticas y % de serie mieloide en médula ósea), permite aproximar el diagnóstico cuando el parásito no se ha observado directamente en la médula ósea, pudiendo integrarse en un procedimiento global de diagnóstico de pacientes con sospecha de leishmaniasis visceral que facilite la toma de decisiones clínicas en tiempo adecuado.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Término Leishmaniasis y palabras clave

2.1.1. Terminología

Tanto el término Leishmaniasis como el de Leishmaniosis están recogidos en el diccionario de la Real Academia Española para referirse a esta enfermedad. No se recoge el término Kala-azar.

Leishmaniasis: 1. f. Med. Zoonosis provocada por un parásito del género *Leishmania*.

Real Academia Española © Todos los derechos reservados

Leishmaniosis: 1. f. Med. leishmaniasis.

Real Academia Española © Todos los derechos reservados

2.1.2. Palabras clave

Leishmania

Leishmaniasis o leishmaniosis

Leishmaniasis visceral

kala-azar

Médula ósea

Sangre

Bioquímica sérica

2.2. Historia de la leishmaniasis

Existe evidencia de la presencia de especies similares a la *Leishmania* (*Paleoleishmania neotropicum*, *P.proterus*) en fósiles de moscas de la arena conservados en ámbar del oligoceno (30 millones de años de antigüedad) e incluso del cretácico (100 millones de años de antigüedad).[1] Se encontraron diversas formas del parásito, incluyendo promastigotes y amastigotes en la probóscide y tracto alimentario de dicho insecto (figura 1).



Figura 1. Amastigotes de *Paleoleishmania neotropicum* en la proboscis de *Lutzomyia adiketis*, fósil en ámbar de 30 millones de años (República Dominicana). (CC BY 3.0)[2]

Las primeras descripciones de la leishmaniasis visceral, conocida como kala-azar (“fiebre negra” en hindi), se realizaron en la India. En 1563, García da Orta, un médico y botánico portugués describió en Goa, un caso de fiebre, “hinchazón del hígado” y afectación del sistema linfático. William Twinning, cirujano destinado en Calcuta publicó en 1832 un libro sobre las enfermedades de Bengala, en el que describía un cuadro con fiebre intermitente,

esplenomegalia y síntomas de anemia, con un aumento de incidencia al final del monzón, que incluso afectaba a europeos y no respondía al tratamiento clásico del paludismo, la quinina.[3]

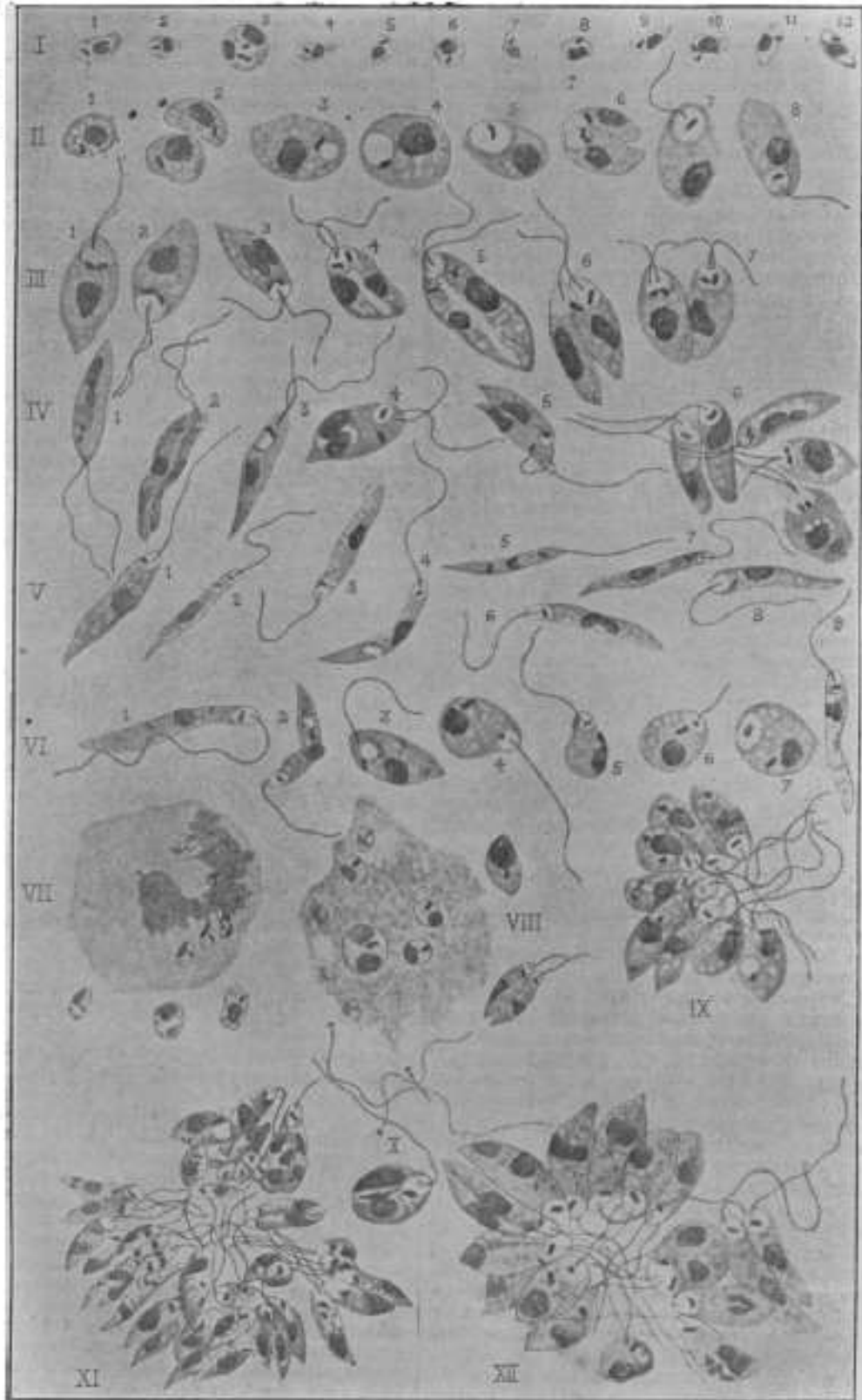
A partir de la década de 1860 la enfermedad alcanzó proporciones de epidemia que diezmo la población y se detectó en otras regiones de la India, sin poder establecerse claramente la causa. Se pensaba que se trataba de una forma virulenta de paludismo o anquilostomiasis y no de una nueva enfermedad.[4]

En mayo de 1903, William Boog Leishman, un médico militar escocés, describió unos pequeños cuerpos ovales en preparaciones *postmortem* del bazo de un soldado que padecía fiebre, disentería y caquexia. El paciente había contraído la enfermedad en Dum-Dum, cerca de Calcuta. Con la tinción de Romanowsky, estos cuerpos contenían una masa redonda grande de cromatina y otra más pequeña en forma de bastón. Leishman consideró que se trataba de alguna especie de tripanosomiasis.[3]

Casi al mismo tiempo, en julio de 1903, el irlandés Charles Donovan, profesor de fisiología de la Universidad de Madrás, indicó que había encontrado los mismos cuerpos en 3 pacientes que se suponía habían fallecido de malaria crónica, y los obtuvo también *in vivo* tras punción esplénica de un niño con fiebre.[3]

Todos estos hallazgos fueron publicados el 14 de noviembre de 1903 en la revista "The British Medical Journal" por el profesor de medicina tropical Ronald Ross, quien daría el nombre de "corpúsculos de Leishman-Donovan" y sugeriría que era un parásito protozoario.[5] Propuso denominarlo *Leishmania donovani*. [3]

En 1904, L. Rogers cultiva material obtenido por punción esplénica y demuestra que se trata de un parásito flagelado (figura 2).[6]



Development of hepatozoans of kala-azar. $\times 1,500$.

Figura 2 . Imágenes de la *Leishmania* en sus distintas fases. Rogers L. The Milroy Lectures on kala-azar. Br Med J. 1907. Publicado con número de licencia 4652670925729 de BMJ Publishing Group Ltd.

A lo largo de las primeras décadas del siglo XX se detecta la leishmaniasis en numerosos países del mundo, incluyendo el área mediterránea, donde Pianese detecta el parásito en Nápoles en 1905. En nuestro país es Gustavo Pittaluga quien lo observa por primera vez en Tortosa en el año 1912.[7] En las figuras 4 y 5 podemos observar las imágenes y las descripciones realizadas por este autor, padre de la Hematología española, en el libro “Enfermedades de la sangre”, publicado en 1922.

A lo largo de los años siguientes se generaliza el diagnóstico de la leishmaniasis mediante la punción aspiración de la médula ósea, detectándose en los frotis teñidos la presencia de los mismos cuerpos de Leishman-Donovan observados en el aspirado esplénico (figuras 3 y 6).



Figura 3. Macrófago medular parasitado por *Leishmania*. Diagnóstico microscópico de las enfermedades de los países cálidos, FW Bach y J Zschucke, 1935).

Recientes observaciones inclinan el ánimo a aceptar esta última opinión.

Muchas veces se aprecia claramente la degeneración y destrucción del citoplasma de las grandes células invadidas por

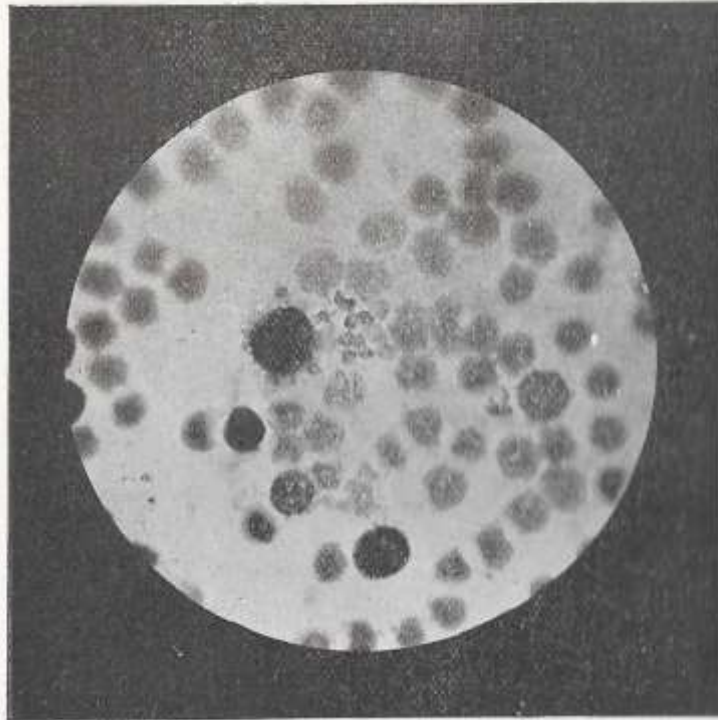


FIG. 73.

Grupo de *Leishmanias* en una preparación microscópica de pulpa esplénica (punción del bazo) en un caso de kala-azar infantil. (Observación personal.)

la leishmania, que aparecen disgregadas, reducidas a pálida sombra alrededor de restos nucleares, en cuya proximidad se hallan siempre muy numerosos parásitos.

En el hígado y en la medula ósea se observa análoga distribución de las formas parasitarias. A veces, las leishmanias abundan extraordinariamente en la medula ósea. El examen histopatológico de estos órganos demuestra, además, que to-

dos los endotelios vasculares, las paredes de los capilares en particular, están repletos de parásitos. Esta localización alcanza, por demás, en grado más o menos intenso, a todos los territorios orgánicos; es natural que en los órganos más vascularizados (higado, bazo) y en el órgano hematopoyético por

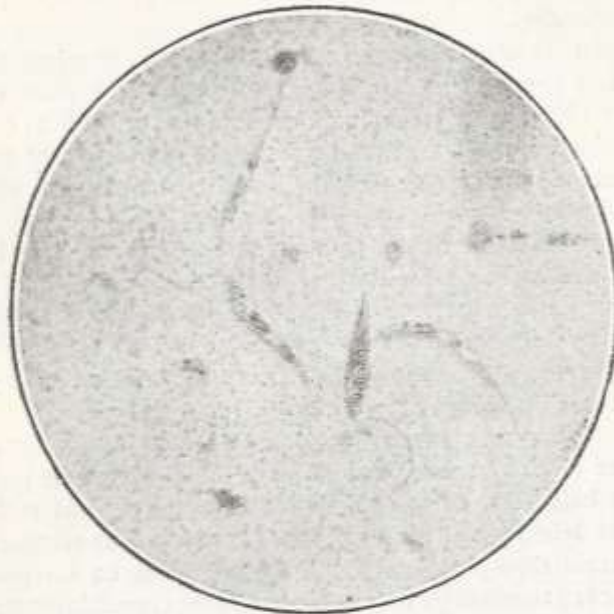


FIG. 74.

Formas flageladas de parásitos del género *Leishmania* (Kala-azar infantil) en cultivos. (Observación personal.)

excelencia (medula ósea), el acúmulo de formas parasitarias sea mayor.

Con el material esplénico extraído ya de un niño enfermo, ya de un animal inoculado (perro), pueden obtenerse, como se ha dicho, cultivos de *Leishmania infantum*. El parásito prolifera particularmente en el agua de condensación, mezclada con hemoglobina y restos de hematies, de los tubos al agar-sangre, y presentan la forma típica flagelada (véase fig. 74). Por lo general, a los cuatro días (temperatura de 22° a 24°); a partir de la siembra se aprecian ya con el examen directo numerosas formas del tipo *leptomonas*, en su mayoría

médula esternal, pero no en la sangre, no estando los plasmidios en las células reticulares, sino en los glóbulos rojos.

Como es sabido, PIANESE y GHEDINI al principio emplearon la punción de la médula para diagnosticar las *leishmaniosis* (Kala-Azar), con la cual aportaron la demostración indiscutible de la presencia del parásito. La punción del bazo, antes empleada, fué suplantada, cada vez más, por la punción esternal y la tibial. Los parásitos están unas veces libres en el parénquima, y otras en el seno de los macrófagos (fig. 143). Esta enfermedad suele evolucionar con una intensa anemia

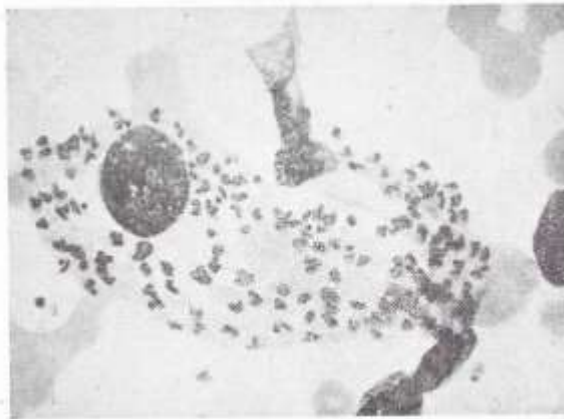


Fig. 143. Kala-Azar. Macrófago de la médula ósea con abundantes parásitos fagocitados (denominados corpúsculos de Leishman-Donovan).

hipocroma y reacción medular eritroblástica (KASSIRSKI, BENHAMOU, GIRAUD y GAUBERT, CATTO, TRINCAO, CARTWRIGHT y colaboradores, SNAPPER, PELÁEZ REDONDO, GUASCH, FORTEZA BOVER).

En la *histoplasmosis*, enfermedad tropical considerada hasta hace poco como muy rara, se consigue demostrar la presencia del hongo patógeno, histoplasma capsulado que afecta primitivamente al sistema retículoendotelial (por eso se denomina, también, al proceso citomicosis retículoendotelial), no sólo en la sangre y en el pus, sino en el producto de la punción esternal. Los corpúsculos, análogos a levaduras, son intracelulares y se encuentran en macrófagos (CURTIS y GREKIN; BAZATTER).

También se ha logrado demostrar la presencia de los agentes causales de la *tripanosomiasis* y de la *lepra*, así como las larvas de la *filariosis*, en el producto de la punción medular (RASTELLI).

En las *enfermedades alérgicas*, además de la eosinofilia medular, se descubre en la médula ósea desviación izquierda de la granulopoyesis, aumento de las células plasmáticas y monocitosis (HABELMANN).

Figura 6 . Macrófago medular parasitado por *Leishmania*. Médula ósea humana, K Rohr, 1950).

Concomitantemente con el descubrimiento de la *Leishmania* se empezó a sospechar de la existencia de un vector responsable de la propagación del parásito, y ya en 1905 Presat sugirió la posibilidad de que fueran las moscas de la arena del género *Phlebotomus*. Pero fue en 1921 cuando los hermanos Edmond y Étienne Sergent, biólogos, los que demostraron que la escarificación de una suspensión de estas moscas de la arena en la piel de voluntarios sanos producía el desarrollo de las lesiones típicas de la leishmaniasis cutánea. Este experimento no se aceptó en general como prueba de que este insecto era el vector, hasta que en 1941 el parasitólogo británico-israelí Saul Adler infectó con éxito a cinco voluntarios con moscas de la arena infectadas a su vez con *Leishmania tropica* experimentalmente en el laboratorio. Un año después, se probó que también eran el vector del kala-azar.[3,8]

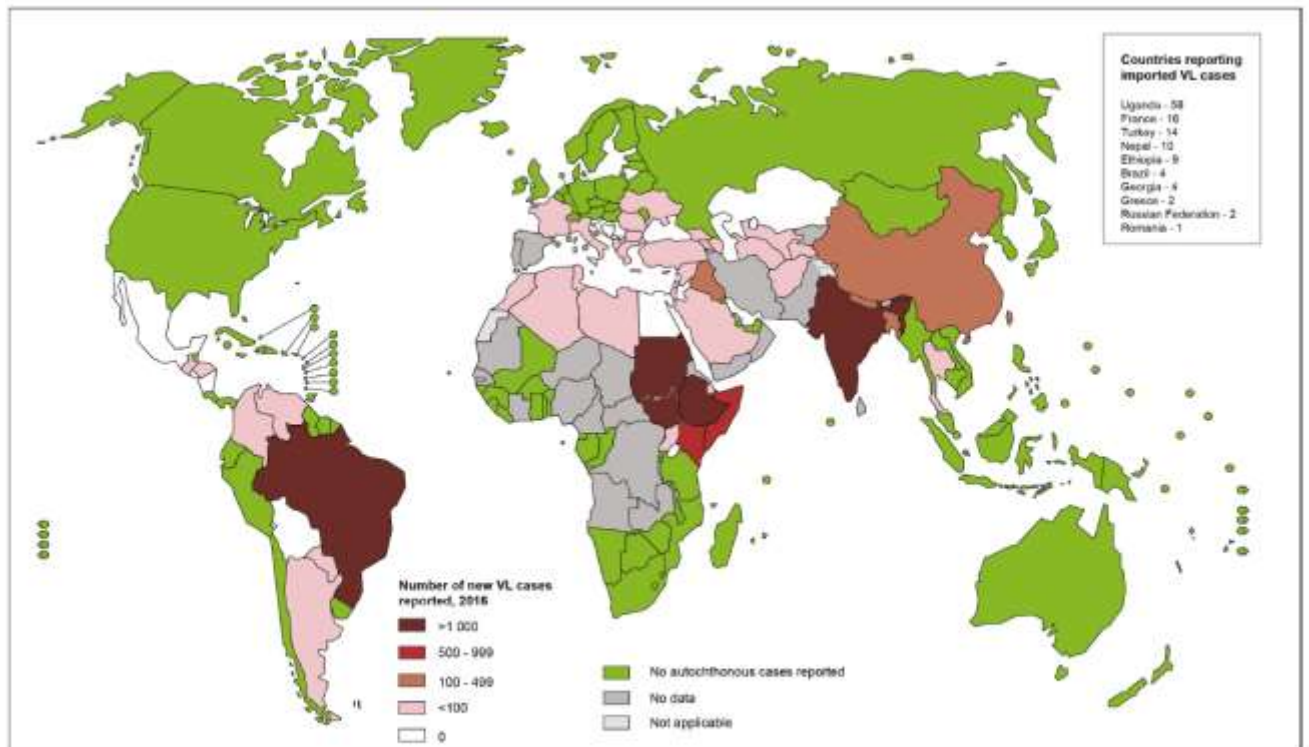
En 1908, el bacteriólogo francés Charles Jules Henry Nicolle, que había descrito en niños de Túnez la especie *Leishmania infantum*, encontró junto con su colega Charles Comte el mismo parásito en los perros, descubriendo el papel de los mamíferos, especialmente el perro, como reservorio de la infestación.[3]

2.3. Epidemiología y distribución mundial de la leishmaniasis

La leishmaniasis es una zoonosis de distribución mundial, extendida por amplias áreas alrededor de todo el mundo. La leishmaniasis visceral es endémica en zonas del norte de África, Oriente Medio, subcontinente indio, Centroamérica, Sudamérica y el sur de Europa, incluyendo España. Cada año se producen entre 1 y 2 millones de casos nuevos de leishmaniasis a nivel mundial, lo que supone entre 20.000 y 30.000 muertes anuales, el 90% de las cuales ocurren en 6 países: Brasil, Etiopía, Sudán, Sudán del Sur, India y Bangladesh. La leishmaniasis visceral es endémica en al menos 88 países.[9,10] El mapa de la OMS detalla la incidencia de la enfermedad en 2016, aunque no se recogen datos de países como el nuestro (figura 7).

La leishmaniasis se incluye dentro de las 13 enfermedades tropicales olvidadas (“neglected tropical diseases” o NTD). Estas enfermedades tienen una importante repercusión en la salud, en la sociedad y en la economía de las poblaciones más pobres del planeta, abarcando amplias áreas de África, Asia y Latinoamérica. La prevalencia de estas enfermedades en las regiones más ricas es escasa, por lo que han sido olvidadas y se dedican menos esfuerzos a su investigación y erradicación.[11]

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2016



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. ©WHO 2018. All rights reserved.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 7. Endemicidad de la leishmaniasis visceral en 2016 (página web de la OMS).

Clásicamente, se distingue la leishmaniasis del “Viejo Mundo” (Eurasia y África) y la del “Nuevo Mundo” (América). En función de la forma de presentación clínica la leishmaniasis se puede clasificar en leishmaniasis cutánea, visceral y mucocutánea. [12] En la tabla 1 se muestran los principales síndromes clínicos, las subespecies causantes de éstos y su distribución geográfica.

Tabla 1. Especies de *Leishmania* presentes en humanos, distribución geográfica y síndromes clínicos (Extraída del informe: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis).[9]

Subgénero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Viejo Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Nuevo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <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> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismo principal	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

^a Estatus de especie bajo discusión

^b Posición taxonómica bajo discusión

La **leishmaniasis visceral** se puede considerar la más importante desde el punto de vista de la morbilidad. A nivel mundial, las estimaciones cifran entre 202.200 y 389.100 los casos nuevos anuales de leishmaniasis visceral.[13] La leishmaniasis visceral tiene una menor distribución geográfica en comparación con la leishmaniasis cutánea, con la mayoría de los casos notificados en 6 países (India, Sudan, Sudán del sur, Bangladesh, Etiopía y Brasil) (figura 7), donde se concentran también la mayoría de las muertes, tal y como comentamos previamente.

El parásito que causa kala-azar en países limítrofes con el Mediterráneo, en el sur de Europa y en el norte de África afecta principalmente a los niños pequeños y a los lactantes. Difiere de *Leishmania donovani* hasta tal punto que se justifica la designación de una especie diferente que se denomina ***Leishmania Infantum***.^[14] Podemos apreciar la distribución geográfica de *Leishmania infantum* en el mapa en la Figura 8, donde observamos que también se detectan casos en Irán, Irak y países del Cáucaso. También se han descrito casos de leishmaniasis visceral por esta especie en el Nuevo Mundo, sobre todo en Brasil, donde clásicamente se denominaba *Leishmania chagasi*, aunque se trata de la misma especie, por lo que en general se recomienda denominarla *Leishmania infantum*.^[15]

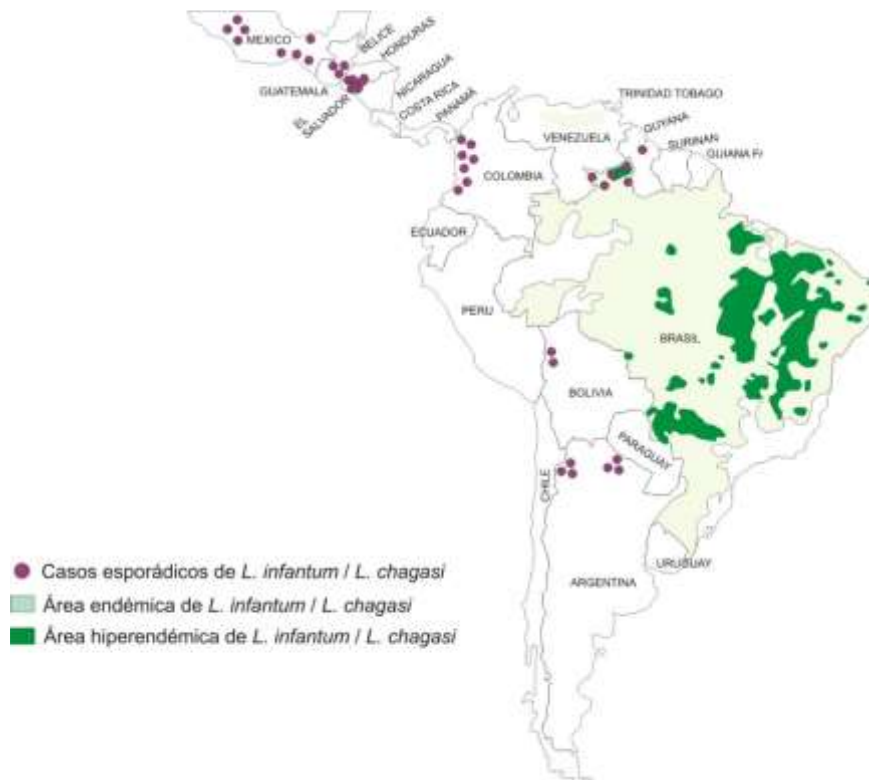
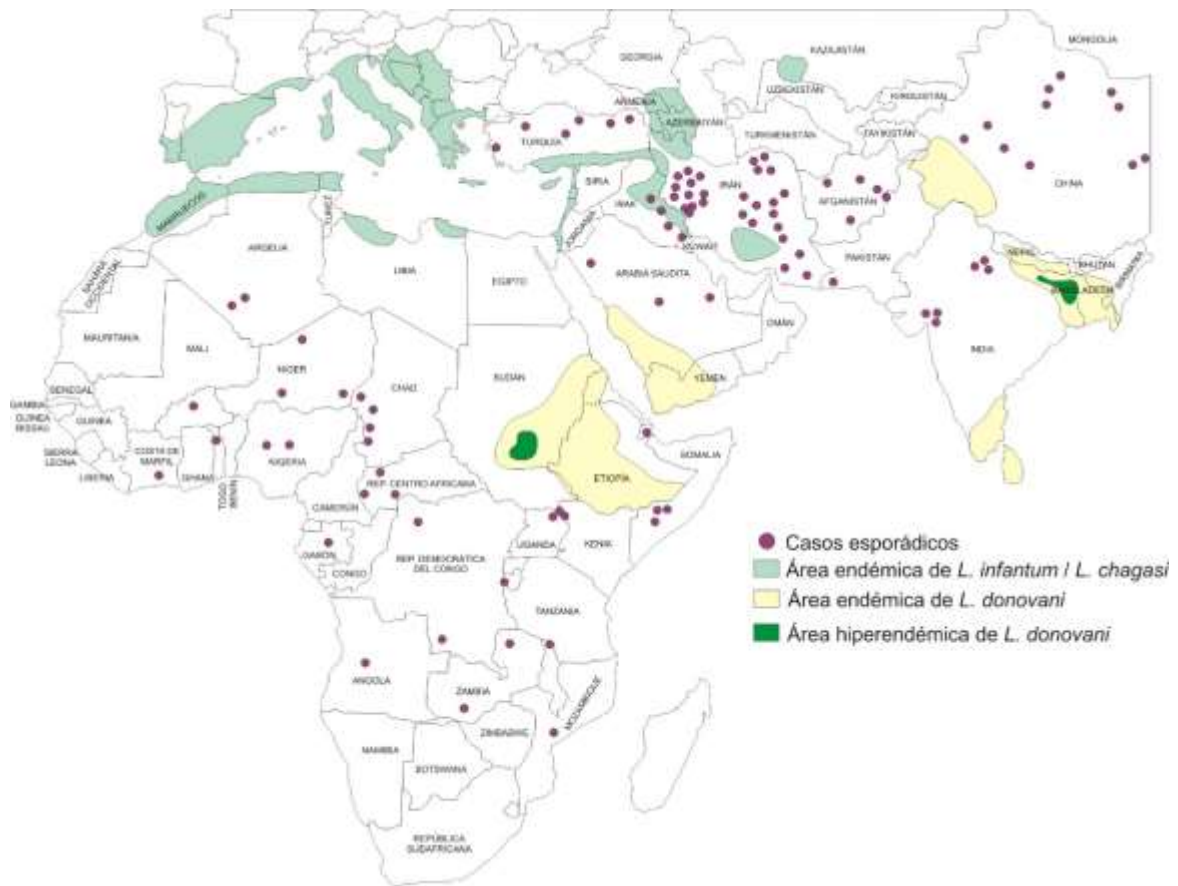


Figura 8. Distribución geográfica de *Leishmania infantum* (CC BY 4.0).[16]

La leishmaniasis es **endémica en España**, aunque desde 1950 la incidencia ha disminuido progresivamente, lo que puede atribuirse al uso de pesticidas en la agricultura y a las campañas de control de insectos llevadas a cabo entre 1940-1950 para eliminar el paludismo. En la década de 1980 se observó un incremento en el número de casos, diagnosticándose la mayoría de los casos en niños. En la década de 1990 los casos infantiles disminuyen porcentualmente a expensas de los casos relacionados con la infección por VIH, lo que supone un cierto repunte de la incidencia. Durante el período 2004-2008, se declararon en nuestro país una media de 117 casos anuales de leishmaniasis visceral, con una incidencia estimada de 140 a 210 casos anuales (0.33-0.46 casos/100 000 habitantes y año).[13] La figura 9 muestra los casos notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) entre 1996 y 2011. En la Comunidad de Madrid, al igual que en el litoral mediterráneo, la incidencia es algo mayor con 15-30 casos anuales (0.3-0.6/100.000 habitantes y año) en los primeros años de este siglo. La tasa de mortalidad es 3.31%.[17]

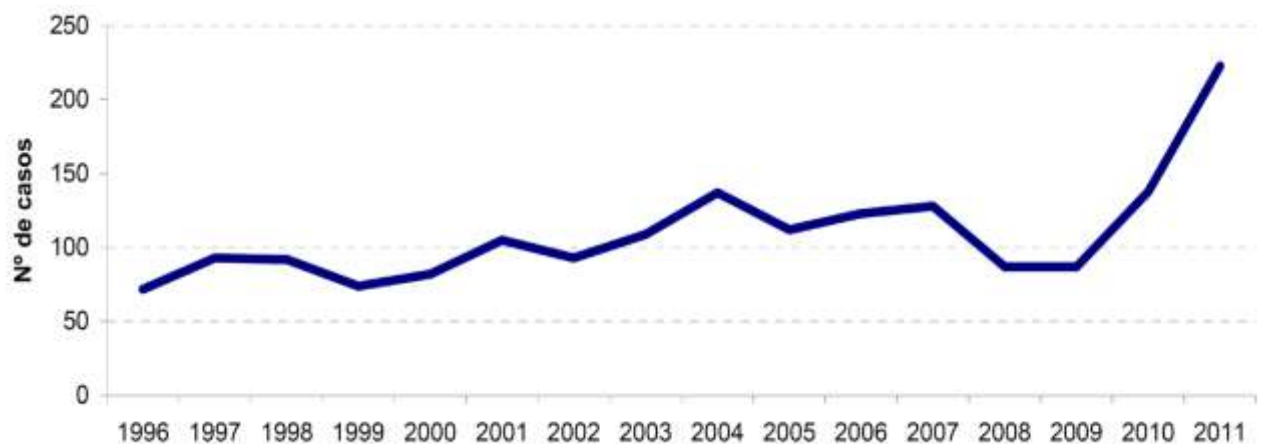


Figura 9. Casos de leishmaniasis notificados a RENAVE (1996-2011). Datos del Centro Nacional de Epidemiología.

La enfermedad en España sigue tres **patrones de presentación**: [18]

1. Patrón endémico, en el que los casos de enfermedad se presentan de forma esporádica y el perro actúa como principal reservorio.
2. Casos asociados a coinfección con VIH y a pacientes inmunodeprimidos.
3. Brotes epidémicos, como el que ha tenido lugar en la Comunidad de Madrid.

En nuestro país un tercio de los casos suceden en niños menores de 9 años, y otro tercio en adultos con infección por el VIH. [19,20]

La transmisión es generalmente periurbana y rural, en zonas residenciales en cuyos alrededores abundan los perros o en zonas en donde se acumulan basuras, material orgánico en descomposición o escombros que favorecen el ciclo biológico de los *Phlebotomus*.

Se han demostrado dos **tipos de transmisión** en Europa según la fuente de infección:

1. **Zoonótico** (reservorio animal) de leishmaniasis visceral y cutánea por *Leishmania infantum*. Es el habitual, con el perro como reservorio más frecuente, pero con la posibilidad de existir otros mamíferos domésticos o salvajes que actúan como reservorio, como las liebres en el caso del brote de Madrid de 2009. [18,21]
2. **Antroponótico** (reservorio humano) de leishmaniasis cutánea por *Leishmania tropica*. Fuera de Europa, la leishmaniasis visceral causada por *Leishmania donovani* también presenta transmisión antroponótica. [9]

Otras vías de transmisión constatadas son la vertical, la sexual, y por transfusión sanguínea. [22,23] También se ha detectado en Madrid la transmisión por el uso de jeringas desechadas contaminadas por *Leishmania* por parte de usuarios de drogas por vía parenteral. [24]

2.4. Descripción del parásito, vector y reservorio de la leishmaniasis

2.4.1. Descripción del parásito y su ciclo

El género *Leishmania*, constituido por protozoos flagelados de la familia *Trypanosomatidae* y pertenecientes al orden *Kinetoplastida*, comprende más de 20 especies diferentes. El género *Leishmania* a su vez se clasifica en dos subgéneros en función del lugar de desarrollo del parásito en el intestino de la mosca de la arena, su vector. El subgénero *Leishmania* se desarrolla en una localización suprapilórica y el *Viannia*, en el intestino medio. El subgénero *Leishmania* se encuentra tanto en el Nuevo Mundo (América) como en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África), mientras que *Viannia* es endémica sólo en el Viejo Mundo.[12]

Las diferentes especies del subgénero *Leishmania* presentes en humanos se encuentran detalladas en la tabla 1.

Estos protozoos del género *Leishmania* se transmiten de manera zoonótica o antroponótica (según la especie de *Leishmania*) por la picadura de las hembras de las moscas de la arena de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, insectos hematófagos y los únicos vectores posibles, que serán descritos con más detalle en el siguiente apartado.[12]

La *Leishmania* presenta un ciclo dimórfico, con una fase sexual que todavía no ha sido descrita, y una fase asexual. El parásito presenta dos formas en su fase asexual: amastigote (sin flagelo) y promastigote (flagelado). Los promastigotes se encuentran en el aparato digestivo y en la probóscide de la hembra del vector *Phlebotomus*. Cuando el *Phlebotomus* pica al huésped, estas formas flageladas se transmiten a la piel y sangre de éste, y son fagocitados por los macrófagos del sistema reticuloendotelial. En esos macrófagos las encontramos como amastigotes, en el interior de los fagolisosomas. Allí se van multiplicando, destruyen la célula, se liberan y van infectando a otros macrófagos. La diseminación del

parásito en el organismo del hospedador y el desarrollo de la enfermedad dependen del tipo y de la eficiencia de la respuesta inmunitaria de éste. A través del sistema linfático y la sangre se extienden hacia otros órganos del sistema reticuloendotelial, encontrándose generalmente en el hígado, el bazo, la médula ósea y los ganglios linfáticos.[25,26] Cuando una hembra de *Phlebotomus* pica de nuevo a un huésped parasitado, puede ingerir con la sangre macrófagos con amastigotes. En el aparato digestivo de *Phlebotomus*, los amastigotes sufrirán una serie de transformaciones hacia la forma flagelada de promastigote, pudiendo infectar de nuevo a nuevos huéspedes al picarles. Este ciclo dura de 4 a 20 días.[12] En la figura 10 se resume el ciclo de transmisión de la *Leishmania*.

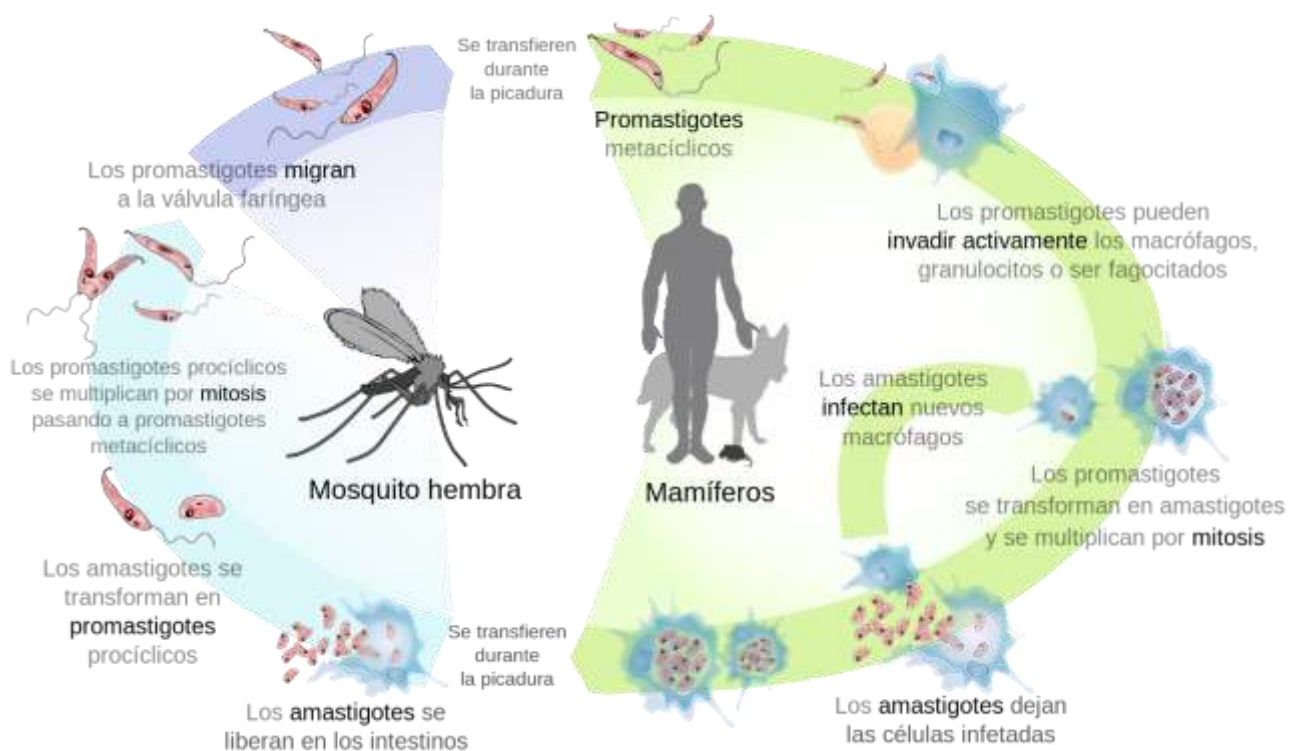


Figura 10. Ciclo vital de *Leishmania sp* (imagen de dominio público).

2.4.2. Vector

Las moscas de la arena constituyen el único vector responsable de transmitir la leishmaniasis: el género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y el género *Lutzomya* en el Nuevo Mundo. Sólo 93 de las 800 especies de mosca de la arena conocidas están implicadas en la transmisión de la leishmaniasis (figuras 11 y 12). Son datos característicos de la mosca de la arena el no hacer ruido, la posición de las alas en ángulo con el abdomen, la coloración variable del negro al blanco y el pequeño tamaño, de 2 a 3 mm de longitud.[12] Es un insecto del orden *Diptera*, suborden *Nematocera*, infraorden *Psychodomorfa*, familia *Psychodidae* y subfamilia *Phlebotominae*. A partir de ahora nos referiremos a la mosca de la arena por el término flebotomo.



Figura 11. Mosca de la arena, especie de África Ecuatorial de la subfamilia *Psychodinae*, no implicada como vector de la leishmaniasis (imagen del autor).

Sólo las hembras son infectivas: tienen un aparato bucal adaptado para perforar la piel y aspirar la sangre, porque la necesitan para poder desarrollar los huevos. Son, por tanto, insectos hematófagos.

Los huevos de flebotomo no presentan desarrollo acuático, sino que se desarrollan en la tierra, en hábitats húmedos ricos en materia orgánica.[9] Para su desarrollo requieren temperaturas en torno a los 20 -25°C y humedades relativas superiores al 90%.

En España hay dos especies de *Phlebotomus* que han demostrado ser vectores competentes para transmitir *Leishmania infantum*: ***Phlebotomus perniciosus*** y ***Phlebotomus ariasi***. *Phlebotomus perniciosus*, más abundante, se distribuye por las zonas áridas de la península y el archipiélago balear. *Phlebotomus ariasi* se distribuye por zonas más húmedas: sur de Galicia y Castilla y León, el cuadrante nordeste peninsular (incluyendo la Comunidad de Madrid), el litoral mediterráneo, Mallorca, el norte de Andalucía y la provincia de Badajoz.[20]



Figura 12. Hembra de *Phlebotomus papatasi*, vector de leishmaniasis, sobre la piel tras haber ingerido sangre (CDC/Frank Collins, imagen de dominio público).

La máxima actividad del flebótomo es crepuscular y nocturna, cuando las temperaturas son ligeramente más bajas (aunque por encima de 16-18°C) y con mayor humedad, pero sin lluvia

ni viento.[27] Su velocidad de vuelo es de 1 m/s, considerablemente menos que otros mosquitos, lo que limita su distancia de dispersión a menos de 2 kilómetros. Tienden a volar cerca del suelo, porque el viento limita su movimiento, y éste sopla con más intensidad a mayor altura sobre el suelo.[9]

En España, las tasas de infección de los flebotomos, obtenidas a partir de la disección del insecto y aislamiento del parásito, oscilan entre un 0.4 y un 4.6 %.[20] Durante el brote que afectó al área de Fuenlabrada a partir de 2009, se constató un aumento de la tasa de parasitación.[28] La densidad de flebotomos infectados es otro factor que puede condicionar el aumento del número de casos o brotes epidémicos.[20] En el brote referido se constató también un aumento de la densidad de *Phlebotomus perniciosus*, el principal vector de *Leishmania* en la comunidad de Madrid, desde 16 flebotomos/m² en 2008 hasta 50 flebotomos/m² en 2012.[28] Aparte de la presencia del vector, debe coincidir en el mismo espacio con un animal que pueda actuar como reservorio, y es esta coincidencia la que va a condicionar el aumento del número de casos. Si además este espacio es una zona urbana, tenemos las condiciones necesarias para el desarrollo de un brote.[20]

En España, la actividad de los flebotomos tiene carácter estacional, comenzando entre marzo y junio (antes en las regiones del sur) y acabando entre octubre y noviembre. En las zonas del norte el período de actividad sería de unos 4 meses, mientras que en las regiones más cálidas del sur llegaría a 8 meses. Los períodos con más riesgo para la transmisión son junio y julio, pero también finales de septiembre y principios de octubre. De hecho, durante el brote de 2009 en Fuenlabrada, aun existiendo casos a lo largo de todo el año, se constata un pico de casos entre los meses de diciembre y febrero,[28,29] que se detectan una vez transcurrido el período de incubación, de 4 a 5 meses de media.

2.4.3. Reservorio

El reservorio habitual en nuestro medio es el **perro** (*Canis familiaris*). La leishmaniasis constituye además un importante problema de salud en estos animales domésticos, que motiva incluso campañas publicitarias (figura 13). Muchos perros no presentan síntomas de leishmaniasis, pero presentan la misma capacidad de transmitir la enfermedad.[29]



Figura 13. Autobús público de Madrid con anuncio de promoción de un collar para perros con sustancia protectora frente a los flebotomos (imagen del autor).

Durante el brote de Fuenlabrada, llamaba la atención la menor seroprevalencia de *Leishmania* en los perros de esta área respecto a otras zonas de la Comunidad de Madrid. Se estudiaron por ello otros animales, como los lagomorfos, detectándose la presencia de *Leishmania* por PCR en el 22% de las **liebres** (*Lepus granatensis*) y **conejos** (*Oryctolagus cuniculus*).[29] Se ha confirmado la liebre como reservorio de *Leishmania infantum* en otras regiones de nuestro país.[30] También se ha demostrado por estudios de xenodiagnóstico directo que ambos lagomorfos pueden transmitir el parásito a los flebotomos.[21,31]

2.5. Brote de leishmaniasis en la Comunidad de Madrid (2009-2014)

A partir de julio del año 2009, se detectó un brote de leishmaniasis en la zona sur de la Comunidad de Madrid, localizado alrededor de la ciudad de Fuenlabrada. En 2010 se llegaron a declarar 97 casos, por lo que efectuó la declaración de brote comunitario. Entre 2009 y 2014 se han notificado 584 casos de leishmaniasis visceral y cutánea asociados al brote, con una tasa de incidencia media de 20.44 casos/100.000 habitantes y año. Es este el brote con el mayor número de casos descritos en Europa.[28,29,32,33]

Se recuerda que, dadas las características climáticas de nuestro país, en este brote se ha observado un pico de casos coincidente con el principio del invierno y el final de la primavera. Teniendo en cuenta el período de incubación de la enfermedad, se trataría de casos adquiridos durante la época estival del año precedente.[28,29]

El estudio de la **distribución espacial** de los casos del brote relacionó estos con un parque periurbano (Bosquesur) recientemente construido en el noroeste de la localidad de Fuenlabrada. Mediante análisis de agrupaciones se identificaron áreas de riesgo más extensas, dos específicas para los casos de leishmaniasis visceral y una para los casos de leishmaniasis cutánea. El número de casos era menor cuanto más alejados de la zona de riesgo: el 70% de los mismos vivían a menos de 1 km del área de riesgo.[34] (figura 14)

Tal y como comentamos al hablar del vector y del reservorio, en el área descrita coincidían circunstancias medioambientales destacables como son la superpoblación de liebres y la detección de densidades elevadas de *Phlebotomus perniciosus*. [28]

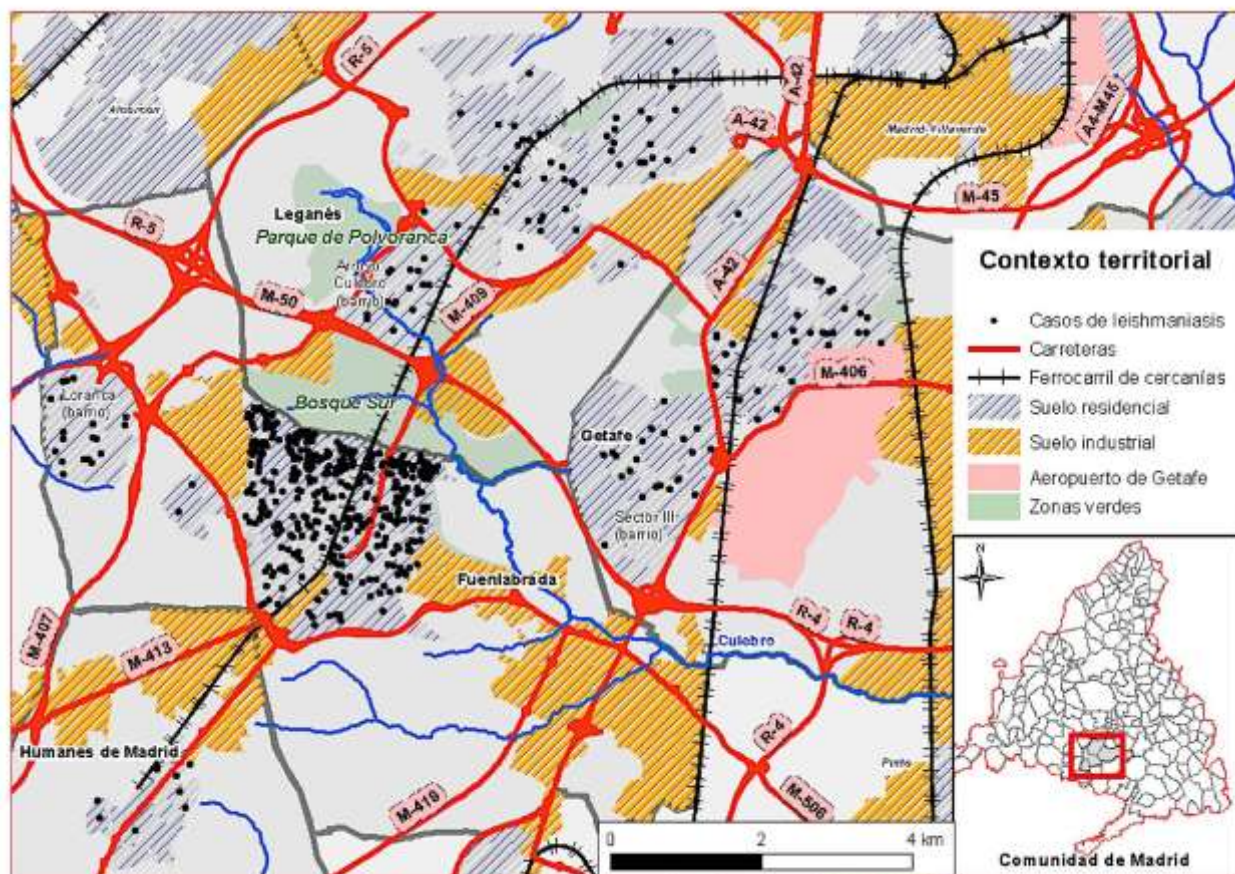


Figura 14. Distribución de los casos en el territorio epidémico según residencia. Brote comunitario de leishmaniasis de la zona suroeste de la Comunidad de Madrid, julio 2009-mayo 2015 (mapa obtenido del documento de la Dirección General de Salud Pública de la Comunidad de Madrid).[27]

Ya se ha comentado que la prevalencia de la infección en los perros en el área del brote no presentaba diferencias respecto a otras zonas o respecto a los años previos. El hallazgo del parásito en más del 20% de las liebres y conejos analizados, muy abundantes en el parque periurbano, la preferencia de los flebótomos por las liebres y la demostración de su capacidad infectiva[21,31,35] llevó a la demostración de que un ciclo en el que participaban **animales silvestres** estaba implicado en este brote.

En resumen, la magnitud del brote de leishmaniasis que ha surgido en el área de Fuenlabrada puede explicarse por la coincidencia de una serie de circunstancias favorecedoras:

1. Presencia de una elevada densidad de vectores, con condiciones climatológicas y ecológicas favorables para su desarrollo.
2. Presencia de un reservorio muy abundante (liebres y conejos), con alta capacidad reproductiva y en un entorno sin depredadores.
3. Núcleo urbano de gran tamaño muy cercano a la zona con alta presencia de vector y reservorio.

Otras características diferenciales del brote se relacionan con su perfil epidemiológico. Según los datos del Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD), entre los años 2000 y 2010, de los 2739 pacientes hospitalizados con diagnóstico de leishmaniasis, un 30.5% eran niños menores de 14 años y un 36.1% adultos coinfectados con VIH.[20] Este es el perfil habitual en una zona endémica donde la población adulta ha ido adquiriendo cierto grado de inmunidad. Sin embargo, en el brote de Fuenlabrada predominan entre los afectados adultos **inmunocompetentes** de todas las edades (71%), con sólo un 14% de niños y un 15% de inmunocomprometidos. Algunos autores plantean que puede coincidir con una población previamente no inmunizada, que entra en contacto de manera más o menos brusca con el parásito debido al cambio de las condiciones ambientales.[36] También es muy llamativo el gran número de pacientes afectados de **origen africano subsahariano**, principalmente de Guinea Ecuatorial y Nigeria. Estos pacientes constituyen menos del 5% de la población de Fuenlabrada, pero representan el 34% de los casos de leishmaniasis visceral recogidos en esta tesis. El análisis de la agrupación espacial de los casos de *Leishmania* también señaló esta asociación.[29,33,34] Esto podría estar en relación con factores genéticos o falta de inmunidad previa (proviene de áreas que sólo presentan casos esporádicos de *Leishmania*

infantum) y podría explicar en parte la mayor presencia de pacientes inmunocompetentes en el brote.

Otra diferencia destacable del brote es el hallazgo de una **nueva cepa** emergente de *Leishmania infantum*, ya presente en Madrid desde 1992. Se trata del genotipo L-920 o L-962m ITS LOMBARDI, descrito por análisis molecular y diferente al habitual MON-1. Es el genotipo predominante dentro de los cuatro genotipos diferentes detectados en el brote.[35]

En cuanto a la distribución de las formas clínicas, 62% de los pacientes desarrollaron leishmaniasis cutánea, mientras que un 38% desarrollaron leishmaniasis visceral.[29] De estos últimos, el 19% desarrollaron linfadenopatía leishmaniásica localizada o **leishmaniasis ganglionar**, una variante poco habitual de la infección por *Leishmania*. [33]

El máximo de incidencia del brote se dio entre finales 2010 y principio de 2012.[29] Tras la declaración del brote, y dado el importante problema de salud que supuso, las autoridades locales y regionales y las instituciones tomaron una serie de medidas de control: captura y sacrificio de liebres y conejos y eliminación de madrigueras, retirada de escombros y desechos de vegetación, control del vector con insecticidas y campaña de información a la población (figura 15).

¿Dónde vive el mosquito-flebotomo?

El hábitat más frecuente lo constituyen madrigueras, cuevas y grietas del terreno, oquedades de los árboles, casas en ruinas, vertederos, alcantarillas, etc., aunque también puede vivir, cuando se dan las condiciones favorables para ello, en sótanos mal ventilados, huecos en vallas, establos, etc.

¿Cómo puedo evitar que el mosquito-flebotomo me pique en casa?

Son recomendables las siguientes medidas, preferentemente en las casas situadas en los bajos y primeras alturas de los edificios y en chalets:

- Aplicar periódicamente insecticidas, especialmente en los cercos de puertas y ventanas como posible vía de entrada, así como en leñeras y muros.
- Utilizar insecticidas eléctricos de uso doméstico.
- Evitar la acumulación de restos vegetales y escombros en las proximidades de la vivienda.
- Realizar adecuadas medidas de limpieza y conservación de aquellos lugares que pudieran servir de refugio al mosquito-flebotomo.
- Instalar telas mosquiteras de malla fina con una luz de 0'3-0'4 mm² en puertas y ventanas.

El uso de aire acondicionado y ventiladores dificulta la presencia del mosquito-flebotomo en el interior de las viviendas.

¿Cómo se utilizan los productos repelentes?

Al usar cualquier tipo de producto repelente, se recomienda:

- Leer y seguir cuidadosamente las indicaciones antes de su uso y consultar al farmacéutico si se tiene alguna duda.
- Utilizarlo siempre en el exterior y en espacios abiertos durante el tiempo necesario y cumplir estrictamente las instrucciones de uso, especialmente el número de aplicaciones diarias permitidas.
- No aplicarlos en niños menores de 2 años, en estos casos la protección ha de hacerse mediante el uso de ropa adecuada que cubra brazos y piernas, y una tela que proteja el cochecito. En niños más mayores deben utilizarse con precaución y evitar aplicarlo en las manos, ya que se las pueden llevar a la boca y a los ojos.
- Cuando ya no sea necesario el repelente, se debe limpiar la piel con agua y jabón.
- En caso de que se presente algún tipo de reacción en la piel, se debe limpiar la zona con agua y jabón y consultar al médico.

COLEGIO OFICIAL DE VETERINARIOS DE MADRID

La Suma de todos
Comunidad de Madrid
www.mad.madrid

Leishmaniosis

Cómo protegerte

La leishmaniosis es una enfermedad producida por un parásito del género *Leishmania* que se transmite por la picadura del mosquito-flebotomo infectado por el parásito. Es endémica en España y otros países de la cuenca mediterránea.

Las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y organismos nacionales e internacionales indican que la lucha contra esta enfermedad se lleva a cabo combinando medidas de protección individual con medidas de salud pública y medioambientales.

Figura 15. Portada y extracto de folleto informativo editado por la Comunidad de Madrid.

Tras el inicio de estas medidas se observó una disminución gradual de casos: de 160 en 2012 se pasó a 39 en 2015.[27,37] A partir de 2015 el número de casos ha continuado disminuyendo progresivamente, y aunque en el momento actual (2019) no se dado por finalizado el brote, el número de aislamientos de *Leishmania* detectados en el Hospital de Fuenlabrada es ya muy bajo (figura 16).



Figura 16. Aislamientos de *Leishmania spp* 2014-2018 (Boletín Epidemiológico del Hospital Universitario de Fuenlabrada, 2018 Vol. 5 N2).[38]

Para hacernos una idea de la magnitud del brote, los datos de Salud Pública de la Comunidad de Madrid recogen 727 casos de leishmaniasis en la zona del brote hasta diciembre de 2017. La figura 17, extraída del boletín epidemiológico de Comunidad de Madrid, y la figura 18, con los datos actualizados en abril 2019, reflejan la magnitud y evolución de este brote.

Tasa por 100.000

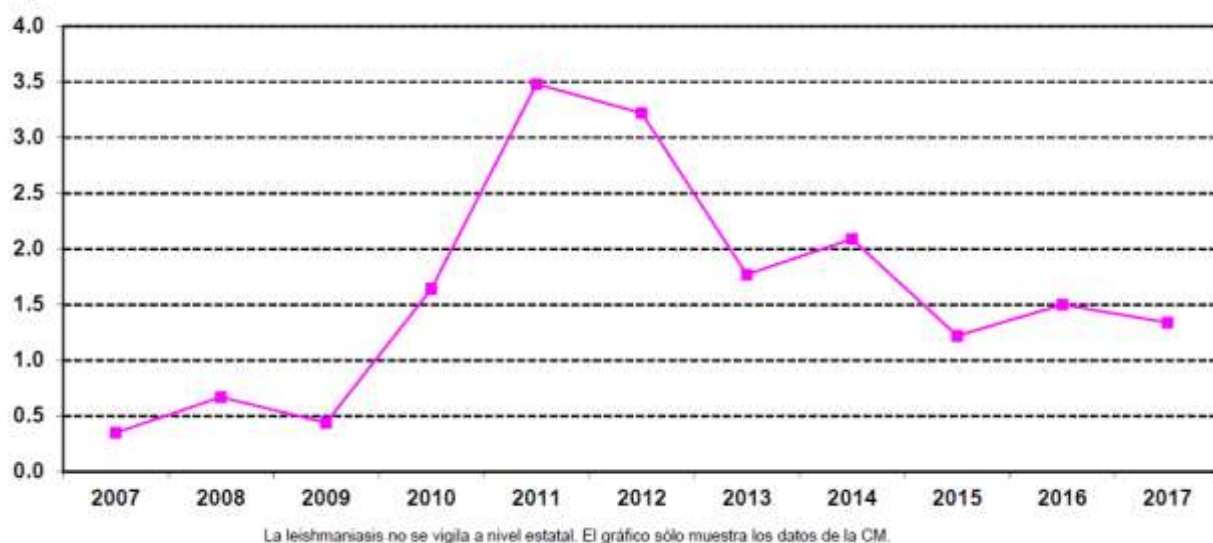


Figura 17. Tasas de leishmaniasis en la Comunidad de Madrid 2007-2017 (Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid).[39]

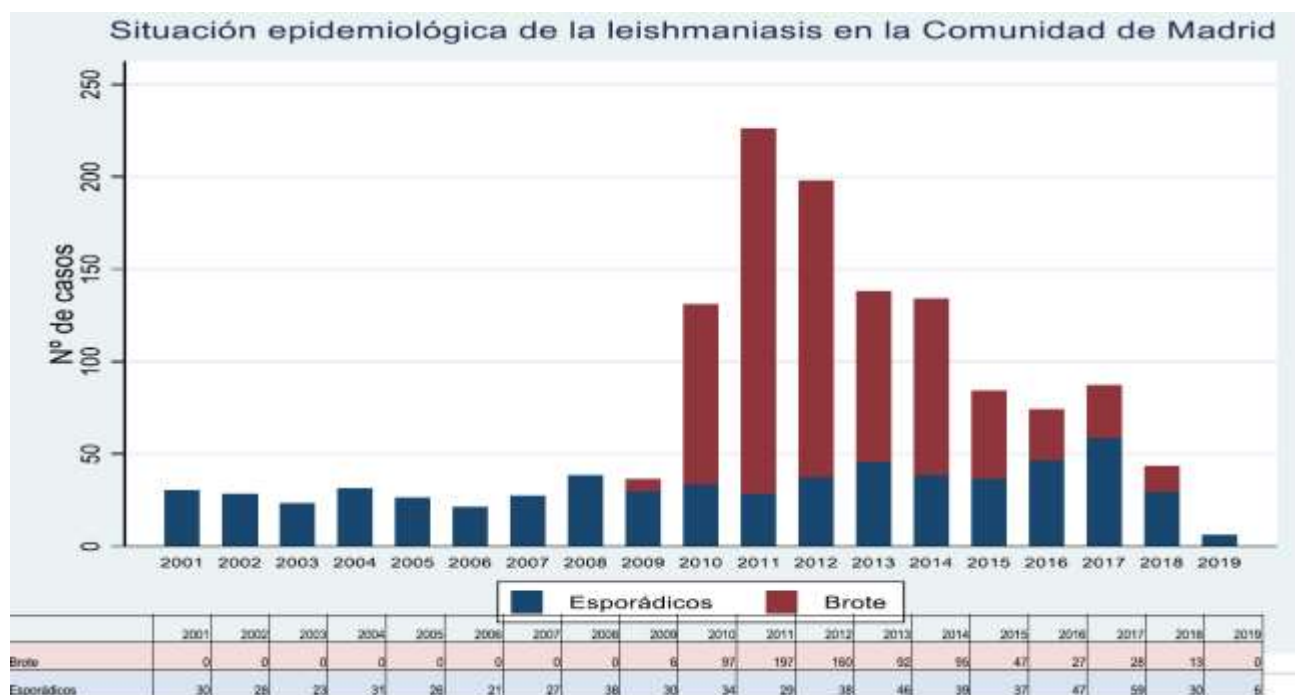


Figura 18. Situación epidemiológica de la leishmaniasis en la Comunidad de Madrid (datos pendientes de publicación de la Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid, Enfermedades de declaración obligatoria, actualizada a 23/04/19).

2.6. Patogenia de la leishmaniasis

La fase inicial de la leishmaniasis consiste en la **inoculación de promastigotes** en el tejido subcutáneo por parte del flebotomo y la respuesta inflamatoria local. El primer evento patogénico es la adhesión de los promastigotes a células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) y la internalización de los protozoos en estas células. La **adhesión** de los promastigotes a las células presentadoras de antígenos depende de la expresión de moléculas en su superficie (siendo las mejor caracterizadas el lipofosfoglicano o LPG y la leishmanolisina o GP63) y de la presencia de receptores en las células del hospedador (particularmente receptores Fc y CR3 en macrófagos y DC-SIGN en las células dendríticas). Una vez tiene lugar la **internalización en el fagolisosoma** macrofágico, el siguiente proceso clave es la **transformación de promastigotes en amastigotes**. En estudios experimentales se ha observado que para que se produzca este proceso únicamente son necesarias dos condiciones: un ligero aumento de la temperatura (a 32-37 °C) y un descenso del pH (5,5), favoreciéndolo también la captación de hierro ferroso. La siguiente fase patogénica es la supervivencia y multiplicación de los amastigotes en el fagolisosoma, formando la **vacuola parasitófora**. Para ello, se ponen en marcha mecanismos de evasión por parte del parásito y la obtención de nutrientes de los macrófagos. Los macrófagos infectados producen óxido nítrico por vía L-arginina dependiente como mecanismo innato para matar los amastigotes de *Leishmania*; esto es inhibido por el parásito, que se multiplica en la vacuola parasitófora.[40]

La proliferación de amastigotes en el interior de la vacuola parasitófora tiene un límite, produciéndose la muerte celular con **liberación de los amastigotes** al medio extracelular que, a su vez, son captados por otros macrófagos (figura 19).[41,42]

dentro de los cuales pueden sobrevivir sin problemas al no ser estas células capaces de destruir el parásito.

Los macrófagos y las células dendríticas presentan los antígenos de *Leishmania* a las células T colaboradoras, y esto da como resultado:

1. una respuesta inmune celular efectiva: un patrón Th1; o
2. una respuesta inmune ineficaz: un patrón Th2.

En la **respuesta Th1** (figura 20), las células T activan los macrófagos (activación macrofágica clásica o M1) que liberan las citocinas interferón- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2).[45] Modelos murinos de leishmaniasis visceral y cutánea han demostrado que los linfocitos T CD4-colaboradores juegan un papel crítico en el control de la infección a través de la interacción con las células presentadoras de antígeno expuestas a la *Leishmania*, con el resultado de la liberación de IFN- γ . Éste estimula a los macrófagos activados para producir óxido nítrico causando la eliminación de los amastigotes intracelulares, La efectividad de lo cual dependerá de la cantidad de óxido nítrico liberado y de la magnitud del efecto supresor de la IL- 10 producida por los linfocitos T reguladores. Por tanto, los factores de inmunosupresión adquirida pueden modular la expresión de la leishmaniasis, como ocurre con los pacientes infectados con VIH, que tienen una mayor susceptibilidad a la leishmaniasis visceral.[12]

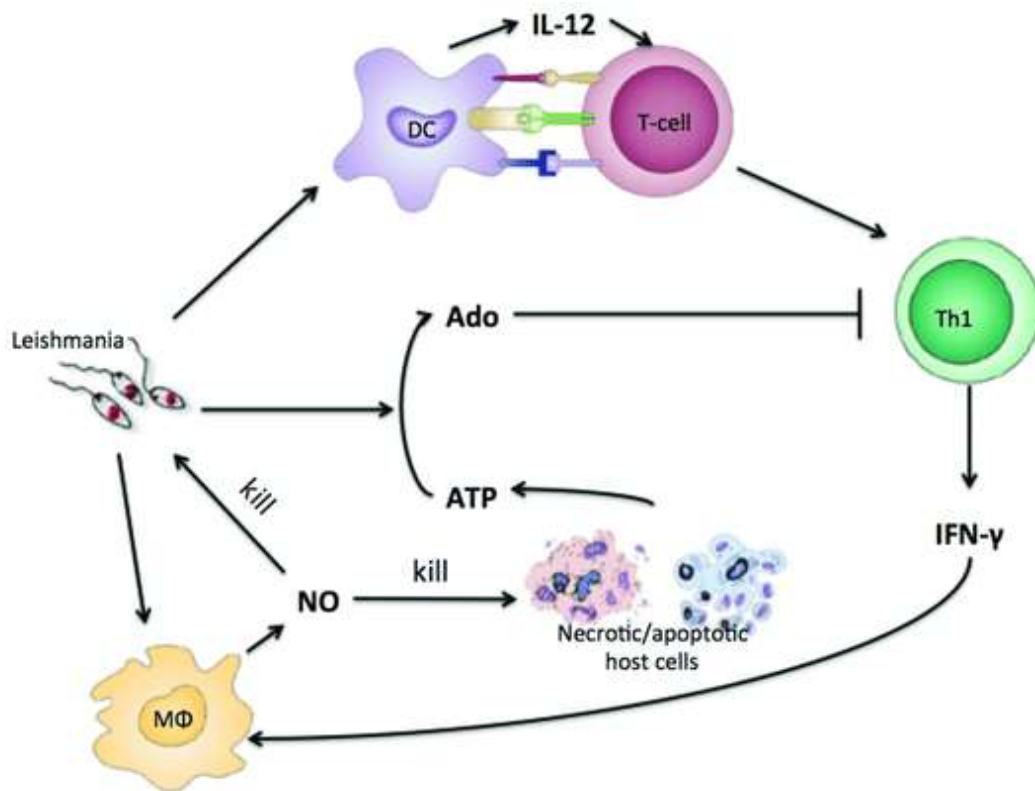


Figura 20. Respuesta Th1 frente a *Leishmania* (CC BY).[46]

En la **respuesta Th2** (figura 21), las células T liberan citocinas (IL-4 y / o IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que inhiben la destrucción de los amastigotes mediada por los macrófagos. La IL-10 es una citoquina reguladora que puede ser producida por linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales, como posible mecanismo homeostático para proteger a los tejidos del daño colateral causado por el exceso de inflamación asociada a una infección persistente. La relación entre IL-10 y leishmaniasis visceral está firmemente establecida: los pacientes con enfermedad activa tienen elevados niveles de IL-10 en suero, junto con aumento de expresión de mRNA de IL-10 en el tejido lesional. Algunos polimorfismos que producen elevados niveles de IL-10 se asocian con progresión más rápida de infecciones como el VIH, y algo similar podría ocurrir en la leishmaniasis visceral, donde la actividad inmunosupresora de esta citoquina podría

promover la replicación del parásito y la progresión de la enfermedad.[47] Los pacientes con leishmaniasis mucocutánea presentan una hiperrespuesta inmunitaria celular que podría contribuir a la destrucción tisular en esta forma de enfermedad. Los pacientes con leishmaniasis cutánea difusa o leishmaniasis visceral activa muestran una respuesta inmunitaria celular específica contra *Leishmania* reducida o nula, con llamativa producción de IL-10, aunque estas respuestas se recuperan tras un tratamiento adecuado, por lo que no parece que esto esté determinado únicamente por factores genéticos.[48]

Hay también una **respuesta humoral** que se acompaña de una gran producción de anticuerpos contra *Leishmania*, pero son inactivos y no confieren protección; esto se ha vinculado a una activación policlonal de células B, y también está relacionado con la respuesta Th2.

Cada especie de *Leishmania* produce un patrón típico de enfermedad, y la inmunidad celular del huésped (a la que contribuyen factores genéticos, estado de nutrición y comorbilidades) en el momento de la infección determinará si:

1. Se produce una infección clínica o subclínica.
2. Si la enfermedad es visceral, cutánea o mucocutánea.
3. Las lesiones son pocas o difusas
4. La respuesta al tratamiento es completa o parcial.[42]

Existen numerosos datos que reflejan la importancia de la respuesta inmunitaria del huésped (tanto innata como adaptativa) en la evolución de esta infección. Primero, los pacientes curados de una LV presentan resistencia a la reinfección,[49] lo que refleja la capacidad del sistema inmune para controlar al parásito y mantener una inmunidad protectora a largo

plazo. Las poblaciones estudiadas en diferentes áreas geográficas muestran grandes variaciones en la ratio de infección asintomática/sintomática, en probable relación con factores como la virulencia del parásito, la presencia de malnutrición en el huésped,[50] factores genéticos[51] y otros. Como ejemplo, esta ratio en España se calcula en 50:1 en adultos[52] , mucho más elevada que en Etiopía, donde es de 5.6:1.[53]

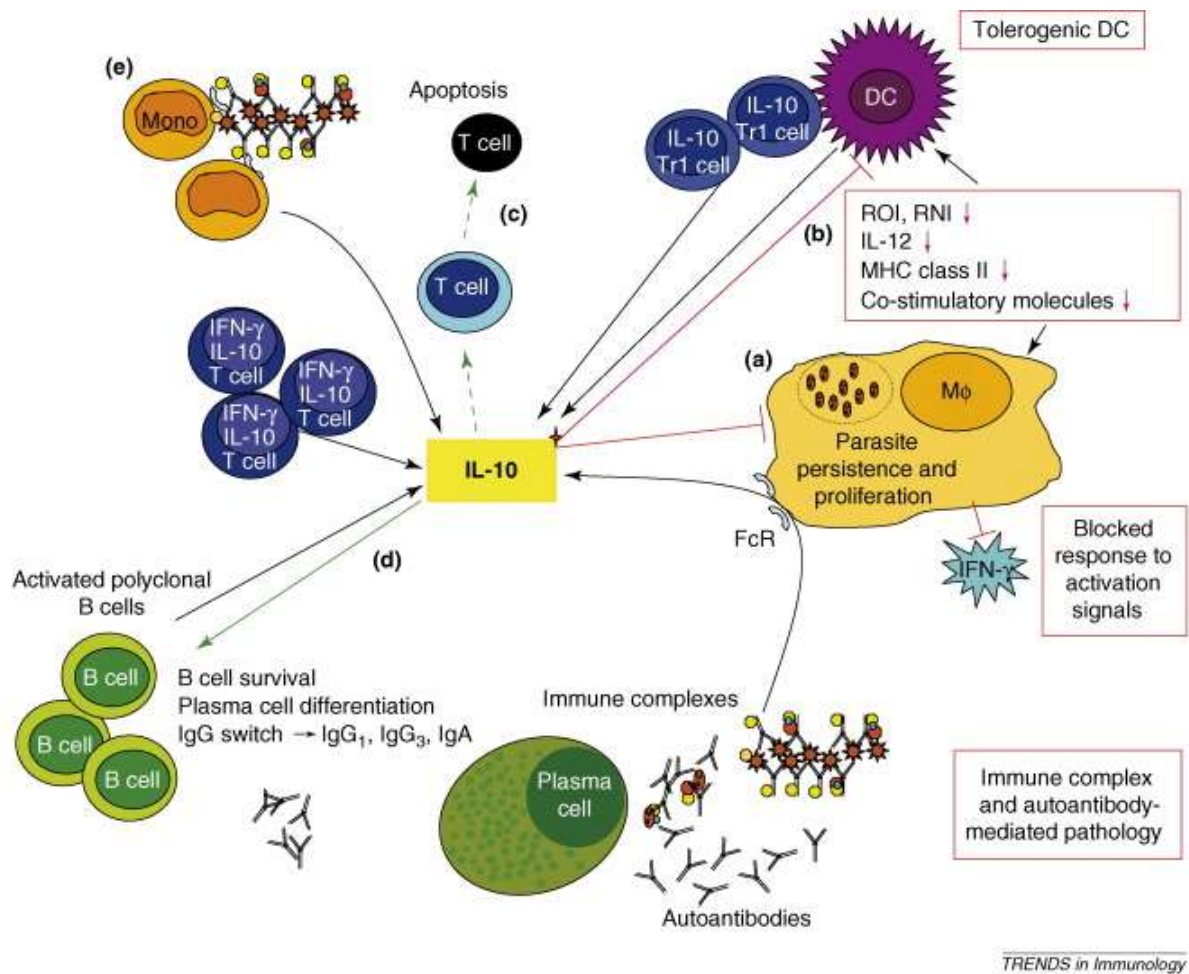


Figura 21. Respuesta Th2 frente a *Leishmania* mediada por IL-10. Utilizado con número de licencia 4663701357740 de Elsevier.[47]

2.7. Manifestaciones clínicas de la infección por *Leishmania*

La mayoría de las infecciones por *Leishmania* son asintomáticas, pero algunos pacientes pueden desarrollar diversas alteraciones clínicas, que también hemos mencionado en apartados previos. Algunas son muy graves, como la leishmaniasis visceral o kala-azar. Otras presentaciones habituales son las leishmaniasis cutáneas (formas no complicada y difusa), la leishmaniasis mucocutánea, la leishmaniasis ganglionar y la leishmaniasis dermal post-kala-azar.[9,12]

2.7.1. Clínica de la Leishmaniasis Visceral

El período de incubación varía entre 2 semanas y 18 meses, aunque lo más habitual es que se sitúe entre 2 y 8 meses, pudiendo tardar los síntomas años en aparecer.[54]

La mayoría de los pacientes con leishmaniasis visceral van a ser niños pequeños de 1 a 4 años de edad.[12]

Entre los adultos, la mayoría de los individuos inmunocompetentes no desarrollarán la leishmaniasis visceral tras la infección. Diversos factores de inmunodepresión van a facilitar el desarrollo de esta enfermedad, siendo por ello la leishmaniasis visceral más frecuente en los pacientes con infección VIH, los trasplantados de diversa índole (órgano sólido o hematopoyético) y los pacientes bajo tratamiento inmunosupresor (esteroides, metotrexato, ciclofosfamida o anti-TNF). La presencia más habitual de estos factores hoy en día es uno de los motivos de que la frecuencia de leishmaniasis visceral en adultos se haya elevado. La coexistencia de leishmaniasis visceral con factores de inmunodepresión puede suponer un factor de confusión, al compartir características clínicas comunes, como la fiebre o las citopenias.[19,55–57] En los casos con inmunosupresión profunda puede haber afectación de

localizaciones anatómicas que generalmente no están involucradas en la leishmaniasis visceral, como el tracto gastrointestinal, el espacio peritoneal, el pulmón, el espacio pleural y la piel.[58] Las personas con infección asintomática pueden presentar síntomas años más tarde, cuando aparezcan factores de inmunodepresión.[54]

Las **manifestaciones clínicas** típicas de la leishmaniasis visceral aparecen de forma subaguda o crónica, y son fiebre prolongada, malestar general, astenia, pérdida de peso, anorexia y hepatoesplenomegalia, que a la exploración es blanda y no dolorosa. Los cambios conocidos que generalmente se encuentran en la bioquímica sérica y en los recuentos sanguíneos son hipergammaglobulinemia y pancitopenia.[9,14]

En la **fase terminal** del kala-azar hay una marcada caquexia, la hepatoesplenomegalia es masiva, hay una gran pérdida de peso, la pancitopenia es pronunciada y aparecen ictericia, edema y ascitis. La anemia puede ser lo suficientemente grave como para precipitar una insuficiencia cardíaca. Los episodios de sangrado son frecuentes, especialmente la epistaxis y hemorragia gingival, asociados a la trombocitopenia y a la disfunción hepática. Las fases finales se suelen complicar con infecciones bacterianas secundarias a la neutropenia. En una proporción significativa se observa una insuficiencia renal leve, reversible con un tratamiento eficaz.[58] Aunque pueden existir casos de curación espontánea, sin tratamiento específico, más del 90% de los pacientes fallece en el plazo de 2 a 3 años.[48] La muerte suele deberse a las sobreinfecciones (neumonía, sepsis, tuberculosis), a diátesis hemorrágica, a enfermedad multiorgánica o a depauperación severa.[12] Incluso con tratamiento, las tasas de mortalidad pueden llegar a alcanzar el 10 %.[58]

Ocasionalmente la enfermedad se puede presentar como hepatitis aguda, colecistitis, o síndrome hemofagocítico o linfohistiocitosis hemofagocítica, siendo en este último caso muy

importante el poder detectar la *Leishmania* como agente etiológico al ser el síndrome hemofagocítico un proceso de muy elevada mortalidad incluso tratándolo como tal.[59]

Pueden existir recaídas a los 6-12 meses de haber completado un tratamiento adecuado.[12]

2.8. Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral

Según la OMS,[9] el diagnóstico de un caso de leishmaniasis visceral implica la presencia de:

1. **Datos clínicos;** fiebre irregular prolongada, esplenomegalia y pérdida de peso. En las zonas endémicas de malaria se exige que la fiebre dure más de 2 semanas y no se haya conseguido respuesta con los tratamientos antimaláricos.
2. **Datos de laboratorio** (al menos uno de los siguientes criterios):
 - a. Parasitología positiva por visualización del parásito en frotis teñidos de médula ósea, bazo, hígado, ganglio linfático, sangre o cultivo del mismo a partir de biopsia o material aspirado.
 - b. Positividad de una técnica serológica (iIFAT, ELISA, rK39 o test de aglutinación directa).
 - c. Detección de DNA del parásito por una técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction).

2.8.1. Métodos parasitológicos

Se han considerado el patrón oro diagnóstico y se basan en la observación directa del parásito en el aspirado medular, en el tejido esplénico o en otros tejidos.[60–62] En nuestro medio lo habitual es la observación de frotis de **aspirado de médula ósea** teñidos con Giemsa o Wright, donde se observan los amastigotes (figura 22). Los amastigotes son cuerpos esféricos u ovoides que miden 1-5 μ de largo por 1-2 μ de ancho, y poseen un núcleo grande y prominente y un orgánulo en forma de varilla llamado cinetoplasto, que es la característica que distingue más claramente los amastigotes de *Leishmania* de estructuras similares como el *Histoplasma*. [58] Aunque este método es rápido, tiene sin embargo frecuentes falsos negativos, en un rango muy variable, del 10 a 73%, en diversos países.[63–72] Hay que tener

en cuenta que la presentación clínica como pancitopenia o bicitopenia suele llevar a la realización de un aspirado de médula ósea, que además de un posible diagnóstico de leishmaniasis visceral nos permite descartar una hemopatía maligna.[12] El diagnóstico correcto requiere personal bien entrenado, lo que es más difícil para los países donde la leishmaniasis visceral sólo se ve excepcionalmente.[73] Distintos autores han señalado la presencia de alteraciones diferenciales en la médula ósea de los pacientes con leishmaniasis visceral, como la hiperplasia eritroide, la diseritropoyesis, la hemofagocitosis y el aumento de células plasmáticas.[67,71,74] Estas alteraciones podrían ser especialmente importantes cuando se está buscando el parásito y no se encuentra (como los casos de falsos negativos), o cuando la leishmaniasis no es la sospecha principal (sobre todo en zonas no endémicas o hipoendémicas), orientando la búsqueda de los amastigotes ante la aparición de dichos cambios. Algunos de los autores han comparado los pacientes diagnosticados de leishmaniasis con los pacientes con sospecha clínica pero finalmente no diagnosticados, aunque hasta el momento actual no se ha desarrollado ningún modelo diagnóstico predictivo de leishmaniasis visceral basado en dichos hallazgos.[64,69]

El **aspirado esplénico** es también rápido y más sensible (por encima del 90%), pero es un procedimiento más arriesgado, especialmente en pacientes con trombocitopenia (frecuencia de hemorragia 1/1000), y debe ser realizado por un experto.[9,60,75,76] Esta técnica suele realizarse de rutina en áreas de África oriental y el subcontinente indio.[73]

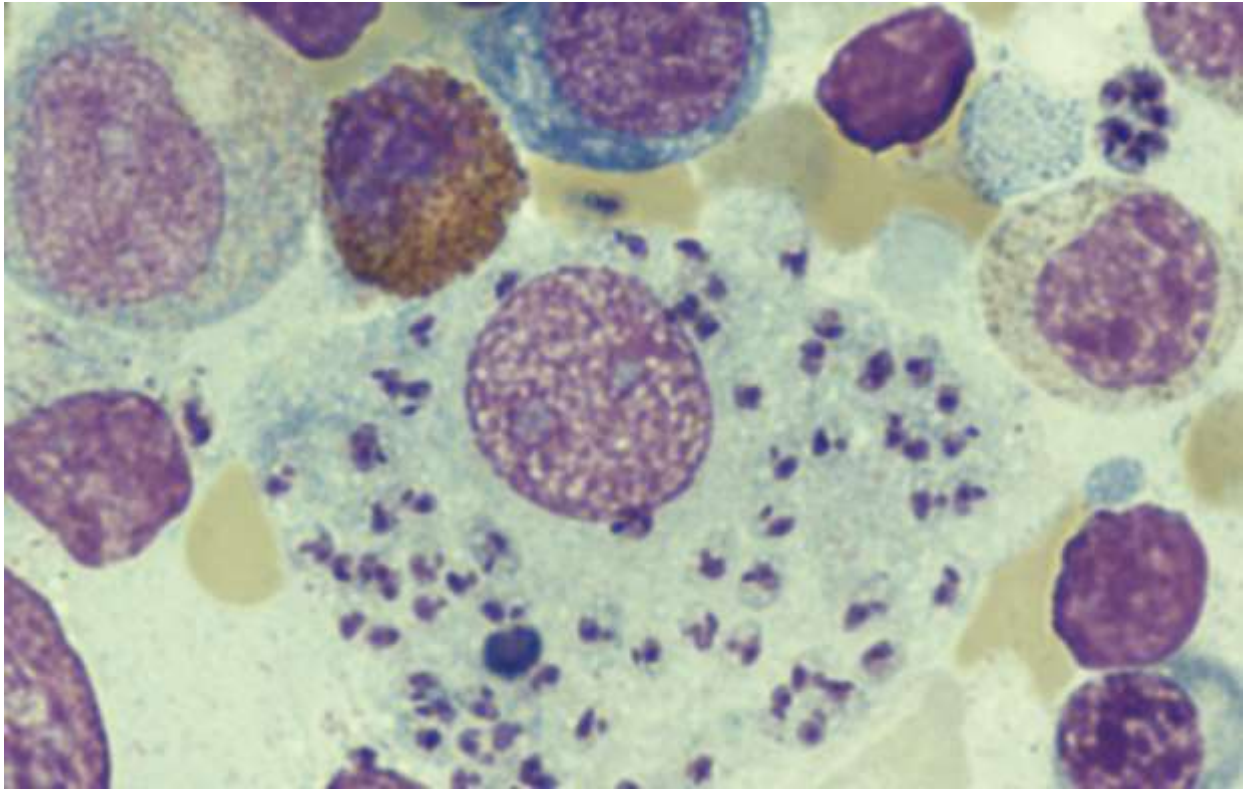


Figura 22. Macrófago de médula ósea parasitado por amastigotes de *Leishmania infantum* (tinción de Wright x1000) (imagen del autor).

El cultivo de las muestras obtenidas aumenta la sensibilidad, pero son necesarias al menos 2 semanas para obtener el diagnóstico.[58]

2.8.2. Métodos serológicos

Las técnicas de detección de anticuerpos comparten una alta sensibilidad para la enfermedad visceral aguda, pero no son estrictamente específicas para esta etapa de la enfermedad. Los anticuerpos disminuyen sólo lentamente después de la curación y también están presentes en un gran número de individuos infectados asintóticamente.[77] Los anticuerpos pueden ser indetectables o estar presentes en niveles bajos en personas con leishmaniasis visceral que están inmunocomprometidas debido al VIH/SIDA simultáneo u a otras razones, lo que complica el diagnóstico en estos pacientes.[16] Por todo ello se están estudiando pruebas

basadas en la detección de antígenos, como un **test antigénico** en orina con alta especificidad (93%) pero sólo un 64% de sensibilidad.[73]

Históricamente, se han utilizado varios métodos serológicos, incluyendo el ensayo ligado a enzimas por inmunoabsorción (**ELISA**), el test indirecto de anticuerpos inmunofluorescentes (**iIFAT**), el ensayo indirecto de hemaglutinación (IHA), y el inmunoblotting, utilizados predominantemente en países desarrollados. Aunque el rendimiento es variable, la mayoría de estos combinan relativamente buenas sensibilidad (80%-100%) y especificidad (80%–100%), pero el diagnóstico suele retrasarse unos días.[78,79] Con la llegada de las nuevas pruebas de diagnóstico rápido (RDT), su uso va disminuyendo.[73]

Un paso importante ha sido el desarrollo del **RDT basado en rK39** recombinante (figura 23). La proteína K39 contiene 39 aminoácidos procedentes de una región kinesina altamente conservada de una cepa brasileña de *Leishmania infantum/chagasi*. Esta prueba barata y fácil de usar funciona bien en el subcontinente indio y constituye una piedra angular en el actual programa regional de eliminación de la leishmaniasis visceral. En una revisión sistemática reciente, la sensibilidad del RDT rK39 en el subcontinente indio se estimó en el 97%, mientras que fue sólo del 85% en el este de África, con valores intermedios en América Latina.[73] En España, la sensibilidad es más baja (83%) en pacientes no VIH.[80] Es importante destacar que el rendimiento del RDT rK39 varía en cierta medida de acuerdo con la marca utilizada, contribuyendo a la heterogeneidad observada en los estudios. En el Hospital Universitario de Fuenlabrada, como luego indicaremos en los resultados de nuestro trabajo, el RDT de la casa comercial Standard Diagnostics, inc., ha mostrado baja sensibilidad, por lo que ha acabado sustituida por un inmunoensayo quimioluminiscente indirecto (CLIA) monotest, que valora anticuerpos IgG+IgM frente a *Leishmania infantum*; esta técnica es más sensible, pero no tan rápida.

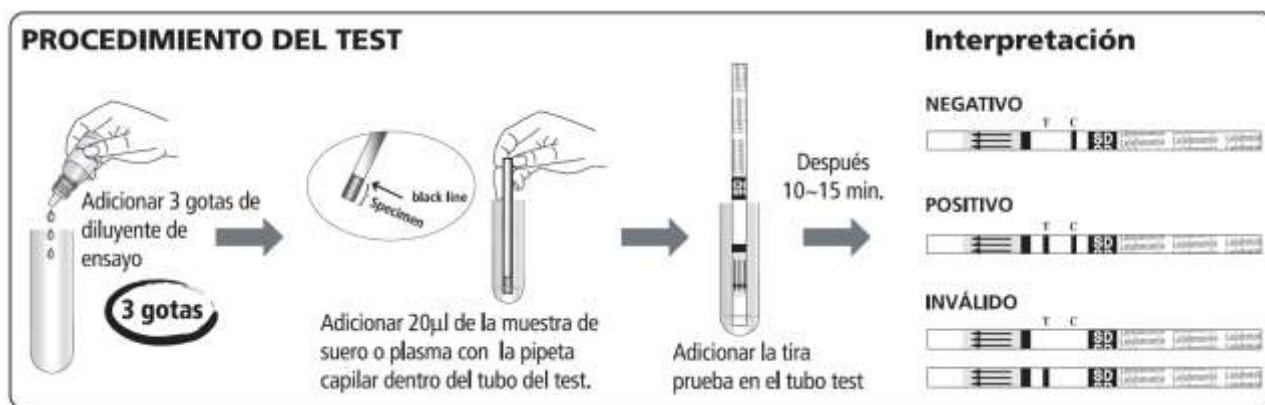


Figura 23. Esquema del procedimiento con un RDT de *Leishmania* basado en rK39 (extracto del procedimiento SD *Leishmania* AB, Standard Diagnostics, inc.).

Recientemente se ha desarrollado un RDT basado en la proteína **rK28**, con buenos resultados en África e India.[73]

Finalmente, mencionar la prueba de aglutinación directa (**DAT**), que puede utilizarse en zonas endémicas con infraestructura de laboratorio limitada. Al usar antígenos parasitarios completos, puede tener falsos positivos, aunque con buena sensibilidad, y también tiene la limitación de demorarse al menos 1 día.[73]

2.8.3. Métodos moleculares

Las pruebas moleculares se utilizan cada vez más para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral. Una revisión sistemática reciente demostró una alta sensibilidad (>95%) con la detección del ADN de *Leishmania* mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de médula ósea, sangre periférica o buffy-coat, sin claras diferencias en el rendimiento en sangre entre *L.donovani* en Asia y el este de Africa y *L.infantum* en el Mediterráneo.[81] Por ello, la PCR en sangre podría ser un primer paso no invasivo interesante en el procedimiento diagnóstico. Sin embargo, la especificidad fue baja (63%–76%) en los estudios mejor diseñados en áreas endémicas. Esto podría relacionarse con una proporción sustancial de individuos sin leishmaniasis visceral que son PCR positivos debido a

una infección asintomática por *Leishmania*. [73] Como desventaja podemos señalar que es una técnica no disponible en todos los laboratorios y que además puede retrasarse varios días.

Para mejorar su rendimiento se han desarrollado variaciones de la técnica PCR, como la PCR anidada, la PCR semianidada y la PCR cuantitativa. Estas pueden realizarse en sangre, muestras de tejido, orina y saliva. La PCR cuantitativa permite diferenciar entre infección asintomática y enfermedad activa. Utiliza DNA del kinetoplasto, cuyos niveles son 500 veces menores en individuos asintomáticos que en pacientes con leishmaniasis visceral activa, por lo que puede ser utilizada como seguimiento de individuos asintomáticos o de pacientes curados. [82]

2.8.4. Aproximación diagnóstica

El procedimiento diagnóstico debe tener en cuenta por un lado las características del medio en el que nos encontramos (incluyendo la localización geográfica, con el tipo de *Leishmania* sospechado y los medios disponibles en nuestro laboratorio) y por otro lado la clínica y características del paciente (muy importante si es o no inmunocompetente).

Si no hay sospecha de hemopatía maligna, podría comenzarse con PCR y serología en sangre, añadiendo alguna prueba serológica más en inmunodeprimidos. Si con esto no se puede excluir o confirmar razonablemente el diagnóstico, se recomienda realizar una prueba invasiva como el aspirado de médula ósea que incluya observación microscópica, PCR y cultivo. En sospecha de recaída, la serología no es útil, debiendo realizarse el diagnóstico mediante test parasitológicos y PCR (idealmente cuantitativa). [73]

2.8.5. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la leishmaniasis visceral incluye neoplasias malignas hematológicas como leucemias, linfomas y síndromes mielodisplásicos, así como

linfocitosis hemofagocítica e infecciones. Las infecciones pueden variar desde infecciones virales comunes (secundarias a virus como el VEB y el CMV) a otras que son relevantes dependiendo de la endemia o los antecedentes de viajes (como el tifus, la brucelosis y la histoplasmosis diseminada) o la función inmune (como el VIH, la tuberculosis diseminada y la toxoplasmosis).[12]

2.9. Tratamiento de la Leishmaniasis Visceral

El informe del Comité Experto de la OMS sobre el Control de la Leishmaniasis de 2010 recomienda no tratar a ningún paciente de leishmaniasis visceral hasta no tener un diagnóstico confirmado según los parámetros establecidos por la misma organización que explicitamos al inicio del apartado de diagnóstico. El tratamiento seguirá las guías nacionales o regionales, teniendo en cuenta la especie en algunas regiones y también el estado inmunológico del paciente (por ejemplo, la coinfección con VIH). Además del tratamiento específico, puede requerirse tratamiento de soporte previo como rehidratación o suplementos nutricionales.[9]

Todos los pacientes con leishmaniasis visceral confirmada deben tratarse con fármacos antileishmania, para evitar la evolución fatal de la enfermedad.[78] Es por ello muy importante realizar un diagnóstico lo más precoz posible. La eficacia de estos fármacos varía con el estado inmune del huésped y la ubicación geográfica donde se adquirió la infección por *Leishmania*. Por lo tanto, las recomendaciones de tratamiento se basan en ello. Es también muy importante reducir los costes de los tratamientos, pues una buena parte de los pacientes viven en países con grandes dificultades económicas para costear estos tratamientos.

Hasta la fecha, la anfotericina-B liposomal y la miltefosina son los únicos medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), para el tratamiento de la leishmaniasis visceral.[73]

La **anfotericina-B liposomal** se recomienda actualmente como fármaco antileishmania de primera línea, basado en los datos de eficacia disponibles de diferentes regiones endémicas de LV del mundo.[83] En la India y en la cuenca mediterránea ha sido muy eficaz y segura, menos en África oriental y Brasil, donde fueron necesarias dosis más altas. Aunque tiene un

coste elevado para esas regiones (coste del tratamiento de unos 378 dólares americanos), sigue siendo preferida por su seguridad y su corto régimen (período de 21 días).[73] La anfotericina-B liposomal sustituyó a la anfotericina-B deoxicolato, que presenta efectos secundarios frecuentes como escalofríos y fiebre durante la infusión, flebitis, hipopotasemia e insuficiencia renal, que son menores en su presentación liposomal.

Los **antimoniales pentavalentes**, antimoniato de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®), continúan siendo efectivos en todas las regiones endémicas de leishmaniasis visceral, excepto en el subcontinente Indio (zona de Bihar) donde existen resistencias. Son fármacos que se puede utilizar por vía intramuscular o intravenosa, pero no son bien tolerados por la alta tasa de efectos secundarios (prolongación del QT y otras alteraciones electrocardiográficas, elevación de enzimas hepáticas y de lipasa, anemia y trombopenia).[84]

Otras alternativas son la **miltefosina** y la **paramomicina**, el único fármaco oral disponible. Para evitar resistencias se recomienda usarlas en combinación con la anfotericina-B liposomal. La pentamidina no se usa rutinariamente por sus efectos secundarios como la diabetes.[73]

2.10. Modelos diagnósticos predictivos

El diagnóstico de una enfermedad es un proceso en muchas ocasiones complejo, al que se llega mediante la exclusión de otras posibles causas que presenten una clínica similar o mediante la identificación de datos específicos de dicha enfermedad. Para ello disponemos de numerosas herramientas de diagnóstico, que nos van a permitir por un lado aumentar la probabilidad de un determinado diagnóstico, y por otro disminuir la probabilidad de los diagnósticos alternativos. En muchas ocasiones, las herramientas diagnósticas que más nos acercan al diagnóstico de la enfermedad (con alta sensibilidad y especificidad) no siempre están disponibles, o suponen un elevado riesgo para el enfermo, o un gasto económico importante, o el tiempo que conllevan para llegar al diagnóstico puede demorar una decisión terapéutica importante para el bienestar del paciente.

En este contexto se han desarrollado los **modelos predictivos** o reglas de predicción clínica, que permiten la toma de decisiones en base a la probabilidad estimada de que una enfermedad específica o una condición esté presente en el individuo (modelo diagnóstico) o bien de que un determinado evento va a ocurrir en el futuro (modelo pronóstico). En el modelo diagnóstico, la probabilidad de que exista una enfermedad concreta puede utilizarse tanto para el desarrollo de un segundo escalón de pruebas diagnósticas, como para la decisión de iniciar un tratamiento directamente, o bien para excluir la presencia de una enfermedad grave.[85]

Tanto en los modelos diagnósticos como en los pronósticos, las probabilidades estimadas se basan en combinar la información de múltiples parámetros (predictores) observados o medidos en un individuo, dado que la información de un único parámetro suele ser insuficiente. Es por ello por lo que se han desarrollado modelos predictivos multivariantes,

con el objetivo de ayudar a los médicos en la estimación de las probabilidades y en la toma de decisiones clínicas. Un **modelo diagnóstico de predicción multivariable** es una ecuación matemática que relaciona múltiples predictores para un individuo concreto con la probabilidad o riesgo de la presencia de un resultado particular. Estos predictores (variables independientes desde el punto de vista estadístico) pueden ser datos demográficos, datos de la historia clínica y exploración física o resultados de pruebas radiológicas, de laboratorio o de diversa índole.[85] Para facilitar el uso de estas reglas, a partir de las fórmulas se pueden desarrollar **nomogramas**, gráficas que permiten el cálculo de la probabilidad teniendo en cuenta los valores de los predictores. También se han desarrollado los más sencillos **sistemas de puntuación** o “scores”, en los que a cada predictor se asigna una puntuación y se calcula un resultado (“score” propiamente dicho) a partir de la suma de estas puntuaciones; este “score” estratifica en varios niveles la probabilidad que presentan los pacientes de presentar el diagnóstico concreto.

Los modelos predictivos diagnósticos multivariables permiten al médico estimar la probabilidad o el riesgo de que una enfermedad esté presente o ausente en el momento de la predicción. Estos modelos se desarrollan a partir de los individuos con sospecha de tener esa enfermedad, y para utilizarlos en individuos con la misma sospecha. El modelo se evaluará respecto a un resultado (tener la enfermedad o no), que viene dado por un patrón de referencia.[85]

Se pueden distinguir 3 fases en el proceso de investigación de estos modelos:

1. **Desarrollo** de la regla de predicción. Comprende la identificación de los posibles predictores, evaluando los pesos relativos de cada uno (análisis univariante), la

elaboración de la regla propiamente dicha (análisis multivariante), la estimación de la exactitud de la regla y la validación interna de la misma.

2. **Validación externa** de la regla de predicción. Comprobar la exactitud de la regla en pacientes no incluidos en el estudio de desarrollo. Pueden distinguirse validaciones en otro contexto temporal, geográfico o en otro grupo de pacientes diferente por edad o ámbito de atención (ambulante u hospitalaria).
3. **Estudio del impacto clínico** de una regla en la actitud del médico, valorando posibles cambios en actitudes terapéuticas, reducción de tiempos o de costes y mejora de los procesos clínicos. Eventualmente la regla podría implementarse en la práctica clínica diaria.[86]

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En los pacientes con leishmaniasis visceral, se han descrito anormalidades en los parámetros hematológicos y bioquímicos, junto con alteraciones de la médula ósea. En los hemogramas, los recuentos celulares muestran frecuentemente anemia, trombocitopenia e incluso pancitopenia.[14,25,26,63,65,67–71,74,87–90] Los cambios descritos en los parámetros bioquímicos comprenden el aumento de los niveles de triglicéridos, de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y transaminasa AST, de las inmunoglobulinas séricas y de la proteína C reactiva (CRP).[26,63,65,68,70,71,91] En la médula ósea algunos autores destacan la hiperplasia eritroide, los cambios displásicos (especialmente la diseritropoyesis), los fenómenos de hemofagocitosis y el aumento de la proporción de células plasmáticas.[25,64,67,71,74,87–90,92]

La observación de los amastigotes en el aspirado de médula ósea, estudio parasitológico habitual en nuestro medio, presenta con frecuencia falsos negativos, al igual que la prueba de diagnóstico rápido rK39. Por otro lado, las pruebas que muestran mayor sensibilidad y especificidad, como la PCR y el ELISA, se pueden retrasar varios días. Es por ello por lo que se plantea el uso de otros datos, tanto clínicos como analíticos, que permitan acortar el tiempo para tomar una decisión terapéutica cuando el paciente presenta datos de gravedad.

El importante número de casos de leishmaniasis visceral en relación con la situación del brote detectada en el área de Fuenlabrada justifica el estudio y la investigación de las alteraciones diferenciales presentadas por estos pacientes en los hemogramas, en la bioquímica sanguínea y en la médula ósea. Se postula que algunos de estos cambios o la combinación de varios de

ellos podrían ser muy útiles desde el punto de vista diagnóstico en la detección temprana de leishmaniasis visceral, especialmente en los casos en los que las pruebas diagnósticas habituales no son concluyentes y el paciente presenta datos de gravedad.

La elaboración de un modelo diagnóstico predictivo de leishmaniasis visceral basado en algunos de estos parámetros proporcionaría una base más sólida sobre la cual poder tomar las decisiones terapéuticas en un momento temporal adecuado en estos pacientes en los que no se puede disponer inicialmente de un diagnóstico de certeza.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El **objetivo** de este trabajo es encontrar aquellos datos diferenciales observadas en el hemograma, en la bioquímica sanguínea o en la médula ósea, que permitan orientar el diagnóstico de leishmaniasis visceral en aquellos casos en los que no se visualiza el parásito en el aspirado de médula ósea, en espera de los resultados de las pruebas diagnósticas de certeza como la PCR y el ELISA.

Basados en este objetivo, se postula la siguiente **hipótesis de trabajo**:

“Algunas de las alteraciones diferenciales observadas en los recuentos celulares del hemograma, en la bioquímica sanguínea o en la médula ósea, que presentan los pacientes con leishmaniasis visceral, podrían ser útiles para:

1. Discriminar entre pacientes con y sin leishmaniasis visceral,
2. Aumentar la sensibilidad diagnóstica, con una especificidad aceptable, respecto a la mera observación del parásito en el aspirado de médula ósea, a la vez que se mantiene la ventaja en tiempo respecto a las técnicas de mayor sensibilidad y especificidad como la PCR y el ELISA.
3. Tomar decisiones terapéuticas en tiempo adecuado en los pacientes más graves”.

Este trabajo se concreta en dos **objetivos principales**;

1. **Primer objetivo**: detectar y describir los **datos distintivos** que presentan los pacientes con leishmaniasis visceral en su sangre (recuentos celulares y bioquímica sérica) y en su médula ósea.

2. **Segundo objetivo:** elaborar un **modelo predictivo diagnóstico** de leishmaniasis visceral a partir de estos datos distintivos, para los casos en que el parásito no se ha observado directamente en la médula ósea y aún hemos podido establecer el diagnóstico por otras técnicas, permitiendo así la toma de decisiones en un tiempo adecuado en los pacientes más graves. Realizar posteriormente una validación interna del estudio y también una validación externa utilizando una muestra diferente a los pacientes empleados para la elaboración del modelo.

Se consideran **objetivos secundarios:**

1. Detectar y describir los datos distintivos que presenten entre sí los distintos subgrupos de pacientes con leishmaniasis visceral, establecidos en función de variables como sexo, edad, origen geográfico, estado de inmunidad y otros subgrupos que se puedan establecer en función de los hallazgos del estudio.
2. Integrar el modelo predictivo diagnóstico basado en esos datos dentro de un procedimiento global de toma de decisiones diagnóstico-terapéuticas en pacientes con sospecha de leishmaniasis visceral.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Tipo de estudio

Presentamos un estudio observacional transversal, con recogida retrospectiva de los datos de laboratorio y de los datos registrados en la práctica clínica habitual, de una cohorte consecutiva de pacientes mayores de 15 años tratados en el Hospital Universitario de Fuenlabrada, a los cuales se realizó un aspirado de médula ósea por sospecha clínica de *Leishmania*.

5.2. Hospital Universitario de Fuenlabrada y área de salud

El Hospital Universitario de Fuenlabrada es un hospital integrado en la Categoría II de Hospitales dependientes del Servicio Madrileño de Salud, situado en el municipio de Fuenlabrada. Cuenta con 406 camas y atiende a un área de población en torno a 220.000 habitantes pertenecientes a las localidades de Fuenlabrada, Moraleja de Enmedio y Humanes, situadas en el suroeste de la Comunidad de Madrid (España). El hospital dispone de camas de hospitalización de todas las especialidades médicas y quirúrgicas, con las excepciones de angiología y cirugía vascular, cirugía cardiovascular, cirugía máxilofacial, cirugía pediátrica, cirugía torácica, cirugía plástica y reparadora, estomatología, inmunología y neurocirugía.

5.3. Premisas éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Fuenlabrada (documento de aprobación en el anexo 10.2). Se requirió el consentimiento informado del paciente para realizar el aspirado de médula ósea.

5.4. Definiciones y variables del estudio

5.4.1. Definiciones del estudio

Las definiciones de los conceptos que se van a utilizar en el diseño del estudio son las siguientes:

1. **Fiebre de duración intermedia:** fiebre no localizada que ocurre en la comunidad, de una a cuatro semanas de duración, y no teniendo ninguna orientación de diagnóstico después de que completar las evaluaciones clínicas, analíticas y radiológicas básicas).[93]
2. **Esplenomegalia:** bazo de tamaño > 12 cm por ultrasonografía.
3. **Citopenia:** anemia (hemoglobina < 120 g/L) o leucopenia (leucocitos < $4 \times 10^3/\mu\text{L}$) o trombocitopenia (plaquetas < $150 \times 10^3/\mu\text{L}$).
4. **Paciente con sospecha clínica de leishmaniasis visceral:** en nuestro contexto, paciente con fiebre de duración intermedia o esplenomegalia y al menos una citopenia.
5. **Paciente con leishmaniasis visceral confirmada (LV):** todos los pacientes con sospecha clínica, finalmente diagnosticados de leishmaniasis visceral por uno de los siguientes métodos aprobados por la Organización Mundial de la salud (OMS):[9]

- a. Visualización microscópica de amastigotes de *Leishmania* en la médula ósea.
 - b. Aislamiento del parásito de las células mononucleares de la sangre periférica en cultivo en medio de NNN.
 - c. Detección de ADN de *Leishmania* por PCR en sangre o médula ósea.
 - d. Positividad por serología utilizando técnicas de RDT basado en rK39 y ELISA (IgG+IgM), o iFAT.
6. **Paciente sin leishmaniasis visceral (NLV):** todos los pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis visceral (según lo indicado previamente), pero sin la confirmación de la enfermedad por cualquiera de los métodos diagnósticos aprobados por la OMS.
7. **Paciente con síndrome mielodisplásico (SMD):** todos los pacientes con alguna/s citopenia/s periférica/s diagnosticados de síndrome mielodisplásico durante el mismo período, según los criterios de la OMS.[94] Los síndromes mielodisplásicos son una neoplasia hematológica, constituyen la causa más frecuente de citopenia/s originada en la médula ósea y requieren siempre la realización de aspirado de médula ósea para su diagnóstico. Habitualmente existe una sospecha basada en la morfología alterada de las células sanguíneas, pero siempre hay que plantear la leishmaniasis como uno de los diagnósticos diferenciales al valorar la médula de estos pacientes con citopenias.

5.4.2. Variables del estudio

En el estudio se recogen las variables objeto de trabajo (datos del hemograma, de la bioquímica sérica y de la médula ósea), junto con otros datos clínicos y demográficos. Los **datos clínicos** recogidos fueron: presencia o no de fiebre (temperatura axilar $\geq 38^{\circ}$ C) y esplenomegalia (> 12 cm por ultrasonografía), junto con la presencia de datos clínicos

relevantes como infección por VIH, terapia inmunosupresora (corticosteroides, metotrexate o anti-TNF), neoplasia o enfermedad autoinmune. También se recogieron los resultados diagnósticos de PCR del ADN de *Leishmania*, los cultivos microbiológicos y los estudios serológicos por rK39, iIFAT o ELISA, y el diagnóstico final en los casos no diagnosticados de leishmaniasis visceral. En todas las técnicas microbiológicas y en el aspirado de médula ósea se registró el tiempo transcurrido entre la recepción de la muestra en el laboratorio y la validación de dicho resultado.

Los datos bioquímicos o del hemograma recogidos se obtuvieron de analíticas realizadas el mismo día del aspirado de médula ósea o en su defecto en las 2 semanas inmediatamente anteriores; en caso de no haber analítica previa se admitió un análisis realizado hasta 3 días después del aspirado.

La mayoría de los datos son cuantitativos y el análisis se enfoca en ellos, pero también se recogieron datos cualitativos (como la morfología de las células de la sangre periférica y de la médula ósea). En las tablas 2, 3 y 4 se indican, junto a los parámetros cuantitativos recogidos en el estudio, sus rangos de referencia, y se incluyen los parámetros cualitativos. Estos rangos de referencia son los establecidos en el laboratorio del Hospital Universitario de Fuenlabrada para la población del área de salud atendida.

Los parámetros de **bioquímica sérica** recogidos son inmunoglobulina G, inmunoglobulina A, inmunoglobulina M, creatinina, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, gamma-glutamilttransferasa, alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, lactato deshidrogenasa, triglicéridos, ferritina y proteína C-reactiva (tabla 2).

En el **hemograma** se recogieron hemoglobina, volumen corpuscular medio, ancho de distribución eritrocitaria, reticulocitos absolutos, plaquetas, leucocitos, neutrófilos en porcentaje y absolutos, linfocitos en porcentaje y absolutos, monocitos en porcentaje y absolutos, y eosinófilos en porcentaje y absolutos. También se recogen las alteraciones morfológicas observadas en el frotis y la velocidad de sedimentación globular (tabla 3).

Se recogieron 16 parámetros de **médula ósea**, incluidos los parámetros cuantitativos y cualitativos. Los parámetros cuantitativos de la médula ósea analizados fueron la celularidad cuantitativa (rango 0-5), los megacariocitos cuantitativos (rango 0-5), el porcentaje de serie mieloide (granulocítica), el porcentaje de serie eritroide, la relación mielo-eritroide y los porcentajes de linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y macrófagos. En algunos de los pacientes se realizó tinción de Perls, recogiendo los datos de hierro macrofágico (rango 0-4) y del porcentaje de sideroblastos en la médula ósea. Los parámetros cualitativos analizados (presencia de anomalías morfológicas en las células de la médula ósea) fueron hemofagocitosis, hemofagocitosis de eritrocitos, hemofagocitosis de leucocitos y/o plaquetas, diseritropoyesis, dismegacariopoyesis, disgranulopoyesis y megaloblastosis (tabla 4). Se recogió también la presencia o no de Linfohistiocitosis Hemofagocítica (HLH), siguiendo los criterios del HLH Study Group (Histiocyte Society) de 2004 (tabla 5);[95] de estos criterios, no se tuvieron en cuenta, al no estar disponibles, la ausencia de actividad NK y el CD25 soluble.

Tabla 2. Parámetros de bioquímica sérica.

Bioquímica sérica:	Abreviatura	Rango de referencia y unidades
Inmunoglobulina G	IgG	7-16 g/L
Inmunoglobulina A	IgA	0.7-4 g/L
Inmunoglobulina M	IgM	0.4-2.3 g/L
Creatinina	CR	≤103 μmol/L
Fosfatasa alcalina	FA	30-120 U/L
Bilirubina total	BT	5.1-20.5 μmol/L
Gamma-glutamilttransferasa	GGT	15-85 U/L
Alanina-aminotransferasa	ALT	10-40 U/L
Aspartato-aminotransferasa	AST	14-44 U/L
Lactato deshidrogenasa	LDH	80-250 U/L
Triglicéridos	TG	≤1.7 nmol/L
Ferritina	FER	♀ 12-120 μg/L ♂ 20-250 μg/L
Proteína C-reactiva	CRP	1-5 mg/L

Tabla 3. Parámetros del hemograma y alteraciones morfológicas en sangre periférica.

Hemograma:	Abreviatura	Rango de referencia y unidades
Hemoglobina	HB	♀ 120-160 g/L ♂ 130-175 g/L
Volumen corpuscular medio	VCM	82-98 fL
Ancho de distribución eritrocitaria	ADE	0.11-0.15
Reticulocitos absolutos	RET	50-100 x 10 ⁹ /L
Plaquetas	PLT	150-450 x 10 ⁹ /L
Leucocitos	LEU	4-11.6 x 10 ⁹ /L
Neutrófilos %	NEU%	42-74 %
Neutrófilos absolutos	NEU#	1.5-7.5 x 10 ⁹ /L
Linfocitos %	LIN%	16-45 %
Linfocitos absolutos	LIN#	1.0-3.2 x 10 ⁹ /L
Monocitos %	MON%	4-12 %
Monocitos absolutos	MON#	0.2-0.8 x 10 ⁹ /L
Eosinofilos %	EOS%	0-4 %
Eosinofilos absolutos	EOS#	0.1-0.6 x 10 ⁹ /L
Velocidad de sedimentación globular	VSG	0-30 mm/1 ^a hora
Alteraciones morfológicas (cualitativo)	Célula sanguínea	Alteraciones valoradas
	Eritrocitos	Alteraciones en forma, inclusiones
	Granulocitos	Granulación, segmentación, inmaduros
	Linfocitos	L. activados, otros atípicos, plasmáticas
	Plaquetas	Alteración tamaño y granulación, vacuolas

Tabla 4. Parámetros de médula ósea.

Médula ósea:	Abreviatura	Rango de referencia y unidades
Cellularidad cuantitativa	CEL	2.5-3.0/5
Serie mieloide %	SM%	52-64%
Serie eritroide %	SE%	23-35%
Ratio mielo-eritroide	M/E	1.5-2.6
Linfocitos %	LINM%	6-14%
Células plasmáticas %	CPLA%	0.2-1.6%
Eosinófilos %	EOSM%	1-5%
Monocitos %	MONM%	0-1.1%
Macrófagos %	MAC%	0-1.1%
Megacariocitos cuantitativos	MEG	2.0-3.0/5
Blastos %	BL%	0-1%
Presencia de hemofagocitosis, tipo y grado (cualitativo)	Tipo: 1.Eritrofagocitosis 2. Hemofagocitosis de leucocitos/plaquetas	Grado: No hemofagocitosis Ligera hemofagocitosis Intensa hemofagocitosis
Alteraciones morfológicas (cualitativo)	Disgranulopoyesis Diseritropoyesis Dismegacariopoyesis Megaloblastosis	

Tabla 5. Criterios diagnósticos de la HLH-2004.

Criterio	Punto de corte
Fiebre	-
Esplenomegalia	-
Citopenia (2 o 3 líneas celulares)	Hemoglobina <90 g/dL Plaquetas <100 x 10 ⁹ /L Neutrófilos <1.0 x 10 ⁹ /L
Hiperferritinemia	>500 µg /L
Hipertrigliceridemia o hipofibrinogenemia.	> 3 nmol/L <1.5 g/L
CD25 soluble elevado	>2400 U/mL
Hemofagocitosis	En médula u otros tejidos
Citotoxicidad NK reducida o ausente	Según el laboratorio de referencia

5.5. Metodología y técnicas de medida

Los **parámetros del hemograma** se obtuvieron en los contadores celulares Sysmex XE-5000[®] o Beckman-Coulter LH780[®]. Los **parámetros bioquímicos** se realizaron en los analizadores Beckman-Coulter DXI[®] o Siemens vista[®]. Todos los analizadores pasaron los controles de calidad internos y externos establecidos por la normativa de calidad del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Fuenlabrada, laboratorio que cuenta desde 2014 con la certificación en la norma ISO 9001.

Los **parámetros del aspirado de médula ósea** fueron evaluados por un especialista en Hematología (entre 3 posibles observadores, que siguieron criterios homogéneos basados en las guías de la ICSH (Comité Internacional de Estandarización en Hematología) y en otras publicaciones de referencia.[96–98] El recuento diferencial se realizó sobre 400 células nucleadas de médula ósea, teñidas con colorante de Wright, bajo 400 aumentos (objetivo x40). El rango de celularidad se evaluó en al menos 5 áreas adyacentes al grumo de médula ósea (a 200 aumentos, con objetivo de x20), dependiendo de la proporción entre células hematopoyéticas y grasa: 0 (0% de células), 0,5 (10% de células), 1 (20% de células), 1,5 (30% de células), 2(40% de células), 2,5 (50% de células), 3 (60% de células), 3,5 (70% de células), 4 (80% de células), 4,5 (90% de células) y 5 (100% de células). La cuantificación de megacariocitos fue asignada por el número promedio de megacariocitos por campo (a 200 aumentos, con objetivo de x20) en 5 campos, de acuerdo con la siguiente regla: 0 (0 megacariocitos/campo), 1 (1-2 megacariocitos/campo), 2 (3-4 megacariocitos/campo), 3 (5-6 megacariocitos/campo), 4 (7-8 megacariocitos/campo) y 5 (≥ 9 megacariocitos/campo).

La valoración del hierro medular en el aspirado se realizó mediante la tinción de Perls (azul de Prusia) evaluando en primer lugar el hierro macrofágico en el grumo medular en un rango de 0 a 4 (0 ausente, 1 escaso, 2 normal, 3 ligeramente aumentado, 4 aumentado). Se realizó igualmente un recuento del porcentaje de sideroblastos sobre 100 eritroblastos medulares (incluyendo también el porcentaje de sideroblastos en anillo) y considerando disminuido un recuento inferior al 10%.[99–101] Según los resultados obtenidos se establecieron los siguientes patrones de hierro medular:

1. Deficiencia de hierro: hierro macrofágico 0-1 y $< 10\%$ de sideroblastos.
2. Bloqueo inflamatorio del hierro: hierro macrofágico >1 y $< 10\%$ de sideroblastos.

3. Patrón normal de hierro: hierro macrofágico 2-3 y > 10% de sideroblastos.
4. Sobrecarga de hierro: hierro macrofágico 4 y > 10% de sideroblastos.
5. Anemia refractaria sideroblástica: > 15% de sideroblastos en anillo.

Respecto a las **técnicas de diagnóstico microbiológico**, el RDT basado en rK39 utilizado fue el “SD *Leishmania* Ab” de la casa comercial Standard Diagnostics, inc. (Yongin-si, Gyeonggido, Corea). Los estudios de ELISA para determinar anticuerpos IgG+IgM frente a antígenos de *Leishmania infantum* se realizaron con método colorimétrico y reactivos de la casa comercial Vircell (Granada, España). Estas técnicas se realizaron en la sección de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Fuenlabrada. Previamente a abril de 2011, en lugar de los estudios de ELISA, se había empleado el kit *Leishmania* iFAT de Vircell (Granada, España), que era remitido al Departamento de Microbiología del Hospital Universitario Severo Ochoa (Leganés, Madrid). Para los cultivos de *Leishmania* se empleó el medio NNN (Novy, Nicolle y McNeal). Estos cultivos y los estudios de PCR fueron remitidos al Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid). Para el diagnóstico molecular se empleó una técnica de PCR anidada específica del género *Leishmania* (LnPCR), de alta especificidad; se utilizó también una técnica de PCR cuantitativa a tiempo real para cuantificar la carga parasitaria.

5.6. Ámbito y diseño del estudio

El estudio se realizó sobre pacientes mayores de 15 años atendidos en el Hospital Universitario de Fuenlabrada. Se recogieron las variables descritas en todos los pacientes atendidos en el hospital entre los años 2009 y 2017, y pertenecientes a los grupos definidos

previamente de LV, NLV y SMD (de este último grupo sólo se recogieron datos durante el período 2009-2014).

Se realizaron comparaciones de todas las variables recogidas entre los 3 grupos, y también entre diferentes subgrupos establecidos dentro del grupo LV, basados en algunas de las características cualitativas que se recogieron en el estudio, como estado inmune, origen geográfico, presencia o no de hemofagocitosis y si se habían observado o no los amastigotes en la médula ósea. Entre estos subgrupos se compararon los mismos parámetros que en los grupos iniciales LV, NLV y SMD.

Una vez analizados todos estos datos, se decidió elaborar el **modelo predictivo diagnóstico** a partir de los **casos en los cuales los amastigotes de *Leishmania* no se observaron en el estudio de médula ósea**. Estos pacientes en los que el parásito no se había observado eran los que presentaban un problema diagnóstico, pues era necesario esperar al resto de resultados (cultivo, PCR o serología) para poder decidir si se iniciaba o no el tratamiento específico. Una vez recibidos los resultados de estas técnicas, algunos de estos pacientes fueron finalmente diagnosticados de leishmaniasis visceral, mientras que en otros no se confirmó la leishmaniasis visceral. También se descartaron para el modelo los pacientes del grupo SMD, pues en su gran mayoría (excepto un único caso) no se planteó en ellos la sospecha firme de leishmaniasis visceral tal y como la hemos definido. Se seleccionaron únicamente los pacientes correspondientes al período de tiempo 2009-2014, quedando los pacientes del período 2015-2017 para la ulterior validación externa del modelo.

Por lo tanto, en la **elaboración del modelo predictivo**, realizado con los datos del período 2009-2014, entraron los siguientes grupos de pacientes (esquema 1):

1. **Grupo LV (elaboración del modelo):** todos los pacientes LV en los que no se observaron los amastigotes de *Leishmania* en la médula ósea, pero fueron finalmente diagnosticados de Leishmaniasis visceral por otros métodos.
2. **Grupo NLV (elaboración del modelo):** todos los pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis visceral sin confirmación por ninguno de los métodos aprobados por la OMS.

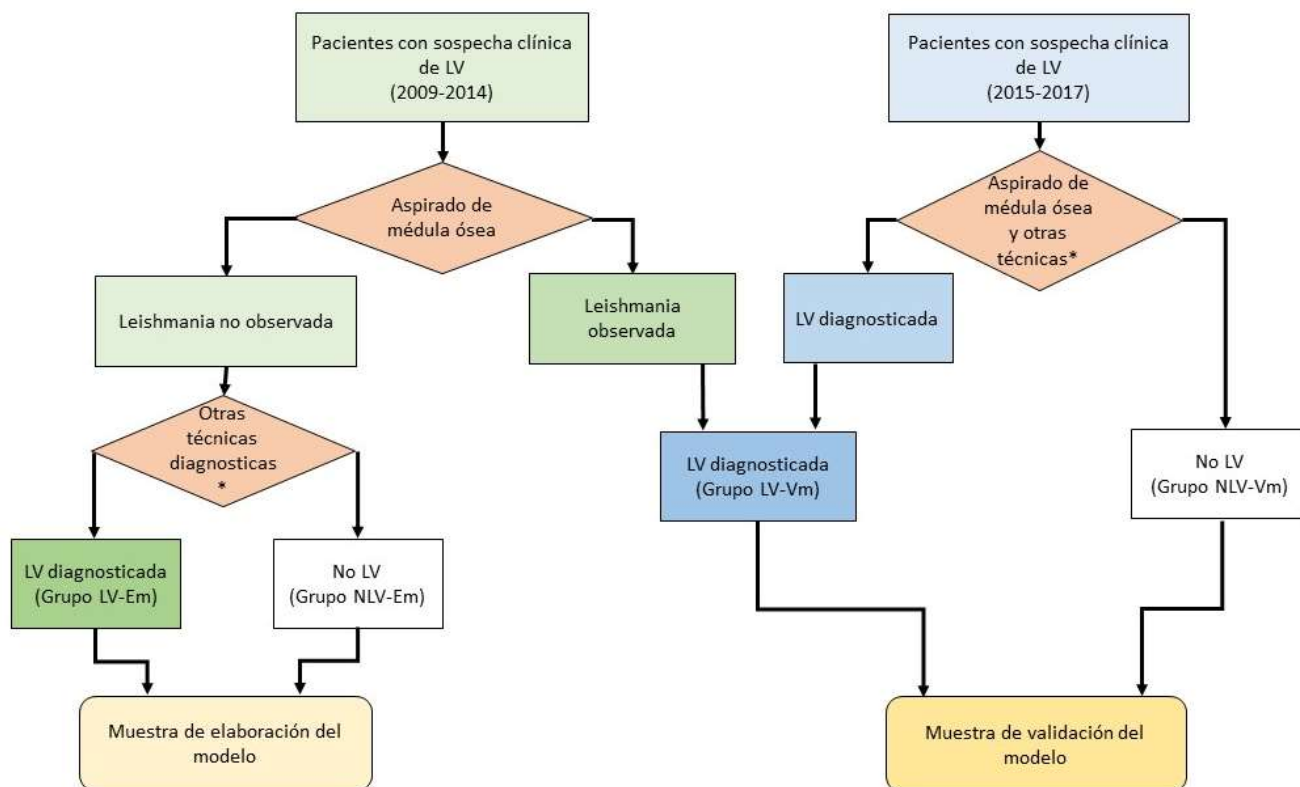
Aunque en este modelo podría plantearse una combinación de datos de laboratorio (hemograma, bioquímica, parámetros de médula ósea) y datos clínicos (presencia de fiebre, esplenomegalia), se decidió tener en cuenta únicamente los parámetros directamente obtenidos de la observación de la **médula ósea**. Esta decisión estaba justificada porque:

1. Desde el punto de vista práctico, estos parámetros (que se obtienen sistemáticamente en todos los aspirados de médula ósea) podían ser valorados concomitantemente en la misma observación en la que se buscaban los amastigotes en el aspirado de médula ósea.
2. Los parámetros del hemograma como hemoglobina, leucocitos o plaquetas estaban incluidos en la definición de sospecha clínica, ya que ésta incluye la presencia de anemia, trombocitopenia y/o leucopenia.
3. Desde el punto de vista fisiopatológico, una gran parte de las repercusiones que presenta la leishmaniasis visceral a nivel analítico tienen relación con la patología que produce en los órganos, especialmente en el bazo y la médula ósea (citopenias, elevación de reactantes de fase aguda, hipergammaglobulinemia) por lo que parecía

razonable valorar los datos directamente obtenidos del órgano, en este caso la médula ósea.

Quedaban por tanto excluidos para la elaboración del modelo predictivo todos los pacientes en los cuales se había observado el parásito en la médula ósea. Estos pacientes pasarían a formar parte de otra muestra destinada a la validación del modelo predictivo, a la que se añadirían los pacientes del período 2015-2017, a los cuales también se realizó aspirado de médula ósea por sospecha clínica de leishmaniasis visceral. Esta muestra de **validación del modelo predictivo** estaba formada por los siguientes pacientes (esquema 1):

1. **Grupo LV (validación del modelo):** pacientes diagnosticados por observación directa de los amastigotes en la médula ósea durante los períodos 2009-2014 y 2015-2017, y pacientes diagnosticados de leishmaniasis visceral en los que no se habían visualizado los amastigotes en los aspirados de médula ósea durante el período 2015-2017.
2. **Grupo NLV (validación del modelo):** pacientes con sospecha clínica de Leishmaniasis visceral no confirmada finalmente por ninguno de los métodos diagnósticos durante el período 2015-2017.



Esquema 1. Grupos de pacientes reclutados por el estudio, sin incluir a los pacientes diagnosticados de SMD. *Otras técnicas diagnósticas: PCR, ELISA y/o cultivos. Em: elaboración del modelo. Vm: validación del modelo.

5.7. Criterios de exclusión

En todos los grupos excluimos todos los casos siguientes:

2. Casos con aspirado de médula ósea no valorable.
3. Casos en los que no se había realizado ninguna de las técnicas de diagnóstico (PCR, ELISA o cultivo) cuando la observación del parásito en la médula era negativa.
4. Casos con sospecha de recaída o en recaída de leishmaniasis visceral.

5.8. Recogida de datos y análisis estadístico

5.8.1. Recogida de datos

Los datos de las variables a estudio (datos del hemograma, bioquímica sérica y médula ósea) se obtuvieron a partir de los sistemas informáticos de laboratorio (Servolab® de Siemens y Modulab® de Werfen). Los datos demográficos y los datos clínicos de práctica habitual se obtuvieron del programa de historia clínica electrónica Selene®, ahora Cerner®, programa de gestión integral de historia clínica utilizado en el Hospital Universitario de Fuenlabrada.

Todos estos datos fueron registrados en una **base de datos** anonimizada destinada a este trabajo de investigación.

5.8.2. Análisis estadístico descriptivo y comparativo

En todas las variables se describieron y compararon los grupos de leishmaniasis visceral frente a los de no leishmaniasis visceral, y también frente a los de síndrome mielodisplásico. Para las variables continuas se describieron la media, la desviación estándar, la mediana y los cuartiles, y las frecuencias absolutas y relativas de los valores anormales respecto a los valores analíticos de referencia. Para las variables cualitativas se describieron las frecuencias absolutas y relativas de los distintos grupos. Se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) en las variables cuantitativas: si eran distribuciones normales se compararon las medias (T de Student o test de Welch en caso de varianzas desiguales) y si las distribuciones eran no normales se compararon las medianas (con la prueba paramétrica U de Mann-Whitney). Para comparaciones entre variables cualitativas se empleó la prueba χ^2 o el test exacto de Fisher cuando en algún grupo el número de casos era inferior a 5. En todas estas pruebas se estableció como límite de significación una $p < 0.05$.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando los programas de análisis estadístico MedCalc® v 11.4.2 y SPSS® v 15.0.

5.8.3. Desarrollo del modelo predictivo

Se decidió elaborar un modelo predictivo teniendo en cuenta los parámetros de médula ósea. En primer lugar, se realizó un **análisis univariante**, comparando cada uno de los parámetros entre los grupos de LV y NLV, siempre mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (medianas), aunque las distribuciones fueran normales. En las variables cualitativas se describieron las frecuencias absolutas y relativas, y se realizó la prueba χ^2 para evaluar la asociación con el diagnóstico. Se elaboraron modelos logísticos univariantes y se realizaron los análisis del área bajo la curva COR, con el objetivo de evaluar la potencia discriminadora de cada parámetro.

Posteriormente se seleccionaron los parámetros en médula ósea con significación estadística (valor $p < 0,05$) y, para la decisión de qué variables podrían incluir en el **modelo multivariante**, se obtuvo la tabla de correlaciones de las variables significativas independientes, para poder valorar correlaciones entre distintas variables y así poder descartar aquellas que estén fuertemente correlacionadas, dado que aportan la misma información. Teniendo en cuenta las variables correlacionadas y el tamaño muestral, se seleccionaron las que se iban a incluir en el **modelo multivariante máximo**. Siguiendo una estrategia de modelización hacia atrás, se descartaron algunas de las variables en el **modelo final**. El modelo multivariante se concretó en una **fórmula** o ecuación matemática, que a partir de las variables potencialmente predictivas que entren en el modelo final, dará como resultado la probabilidad de que un paciente tenga leishmaniasis visceral. Se desarrolló a partir de la fórmula un **nomograma**,

que permite establecer con facilidad esa probabilidad sobre una gráfica, sin tener que recurrir a los cálculos de la fórmula del modelo.

La capacidad de discriminación de este modelo fue evaluada mediante el estudio del área bajo curva COR, que indica hasta qué punto el modelo es capaz de distinguir entre los pacientes con y sin *Leishmania*. La calibración del modelo se evaluó mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow, que establece grupos de riesgo y contrasta los diagnósticos de *Leishmania* pronosticados por el modelo con lo observado en cada grupo de riesgo.

También se estableció un “score” o **puntuación predictiva** para la leishmaniasis visceral, tras categorizar las variables incluidas en el modelo. El poder discriminativo de esta puntuación fue también evaluado por el área bajo la curva COR y su calibración por la prueba de Hosmer-Lemeshow.

5.8.4. Validación del modelo predictivo

Se realizó una **validación interna** del modelo mediante técnicas de “bootstrap”. Estas técnicas consisten en obtener nuevas muestras simuladas a partir de la muestra original, sacando parte de los casos de manera aleatoria y utilizando un muestreo con reposición, de manera que los casos de cada nueva muestra pueden repetirse algunos y otros no aparecer nunca, pero nunca coincidirán totalmente. En esa nueva muestra se calcula el estadístico deseado como estimador de la población (en nuestro caso el área bajo la curva COR); este proceso se replica un gran número de veces. Se trata de valorar el buen desempeño del modelo en el conjunto de los replicados obtenidos por “bootstrap”, calculando el optimismo como la diferencia entre el rendimiento del modelo en cada muestra “bootstrap” y la muestra original

y la media de todos ellos.[102] También en este caso se evaluó la calibración del modelo mediante la pendiente de calibración y la prueba de Hosmer-Lemeshow.

Finalmente, con los datos de los pacientes que formaban la muestra de validación, se realizó una **validación externa**, evaluando el área bajo curva COR tanto con el modelo como con el “score”.

El estudio del modelo se realizó con el programa de análisis estadístico R® v 3.5.0. Para el desarrollo y la validación interna del modelo se contó con la colaboración de la Unidad de Bioestadística del Hospital Ramón y Cajal, y para la validación externa con la Unidad de Apoyo Metodológico del Hospital de Fuenlabrada.

6. RESULTADOS

6.1. Resultados descriptivos generales

De los 190 pacientes que inicialmente se recogieron para el estudio, 18 fueron **excluidos** en base a los criterios de exclusión: 6 casos con sospecha de recaída o en recaída de leishmaniasis visceral, 2 casos en los que no se había realizado ninguna de las técnicas de diagnóstico (PCR, ELISA o cultivo) cuando la observación del parásito en la médula era negativa, y los 10 restantes porque el aspirado de médula ósea no fue valorable (la mayoría porque la muestra de médula ósea fue insuficiente para una valoración correcta).

Por tanto, 172 pacientes fueron considerados **evaluables** para el estudio. En el primer período (2009-2014), coincidiendo con la fase de mayor intensidad del brote de leishmaniasis, se recogieron los datos de 149 pacientes: 79 pacientes con leishmaniasis visceral, 20 pacientes del grupo no leishmaniasis visceral y 50 pacientes del grupo de síndrome mielodisplásico.

En el segundo período (2015-2017) se continuó la recogida de datos de pacientes con sospecha de leishmaniasis visceral, totalizando 23 pacientes más: 16 pacientes para el grupo de leishmaniasis visceral y 7 pacientes para el grupo no leishmaniasis visceral.

6.1.1. Resultados demográficos y clínicos

Los resultados demográficos y clínicos se han descrito para el grupo de pacientes del período 2009-2014.

6.1.1.1. Grupo Leishmaniasis Visceral

La edad media en este grupo fue de 47 años (rango 15-95) y el 77% eran varones. 53% de los pacientes eran españoles y el resto extranjeros, incluyendo un 34% de africanos de la zona subsahariana (grupo que sólo comprende el 5% de todos los pacientes atendidos en el Hospital Universitario de Fuenlabrada). Con respecto a los factores de inmunosupresión, se encuentra un 10% de los pacientes con infección por VIH y un 13% con otros factores de inmunosupresión, principalmente terapias inmunosupresoras. La frecuencia de la fiebre fue del 94% y la de la esplenomegalia 92%.

6.1.1.2. Grupo No Leishmaniasis Visceral

Este grupo presentó una distribución similar de la edad (edad media 52 años, rango 15-86), un 70% eran hombres y un 80% españoles. La frecuencia de la fiebre fue del 80% y la de la esplenomegalia 30%. No había pacientes con infección VIH y un 15% estaban en tratamiento inmunosupresor, con otro 20% presentando otros factores (neoplasia, neutropenia o enfermedad autoinmune). El diagnóstico final de estos pacientes se pudo establecer en el 70% de los casos (entre el total de 27 casos recogidos entre 2009 y 2017): los más frecuentes fueron infecciones virales (incluyendo CMV, VHB y VHC crónicos), infecciones bacterianas (*Mycobacterium tuberculosis*, complejo *Listeria* y *Salmonella*), enfermedades autoinmunes (incluyendo lupus sistémico), neoplasias (linfomas y síndrome mielodisplásico) y otros (fiebre mediterránea familiar y enfermedad de Still) (tabla 6).

Tabla 6. Diagnóstico final de los pacientes del grupo NLV (período 2009-2017)

Grupo diagnóstico	Número y frecuencia	Diagnóstico final	Número
Sin diagnóstico	8 (30%)		
Infección vírica	6 (22%)	CMV	2
		VHB	1
		VHC	1
		Otros	2
Infección bacteriana	3 (11%)	<i>M.tuberculosis</i>	1
		<i>Listeria</i>	1
		<i>Salmonella</i>	1
Enfermedad autoinmune	3 (11%)	LES	1
		Otros	2
Neoplasia	4 (15%)	Linfomas	3
Otros	3 (11%)	Síndrome mielodisplásico	1
		Fiebre mediterránea familiar	1
		Enfermedad de Still	2

6.1.1.3. Grupo Síndrome Mielodisplásico

Los pacientes del grupo de síndrome mielodisplásico tenían una edad media más alta (72 años, rango 55-90), el 62% eran hombres y todos de nacionalidad española.

En la comparación entre los grupos de LV y NLV, es destacable la mayor proporción de hombres sobre las mujeres, junto con la mayor proporción de pacientes de origen africano subsahariano entre los afectados por leishmaniasis visceral. También destaca el predominio de pacientes sin factores de inmunodepresión entre los que estaban afectados por leishmaniasis visceral (figuras 24, 25 y 26).

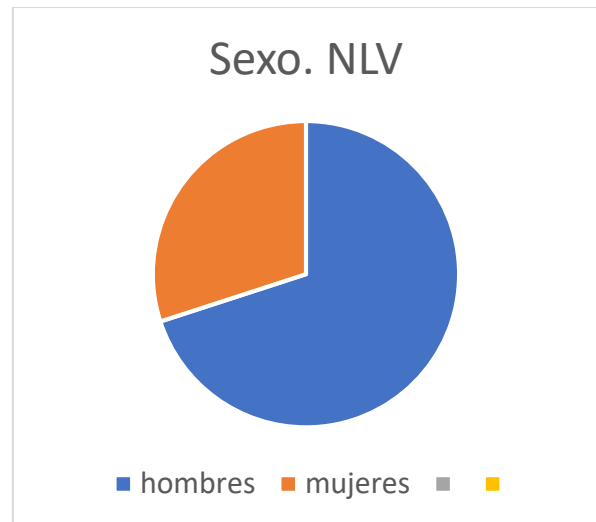
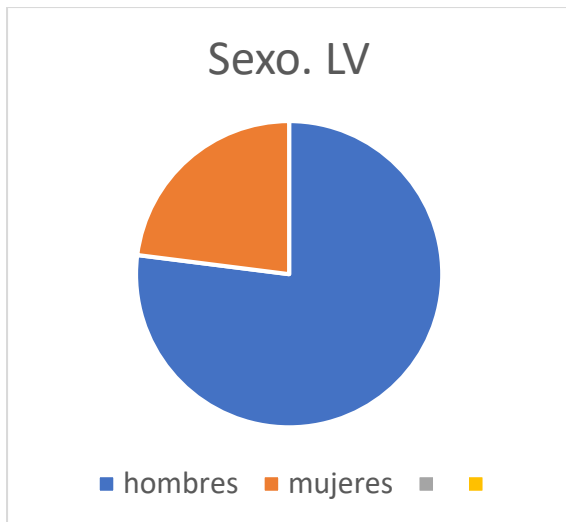


Figura 24. Proporciones de sexos en los grupos LV y NLV.

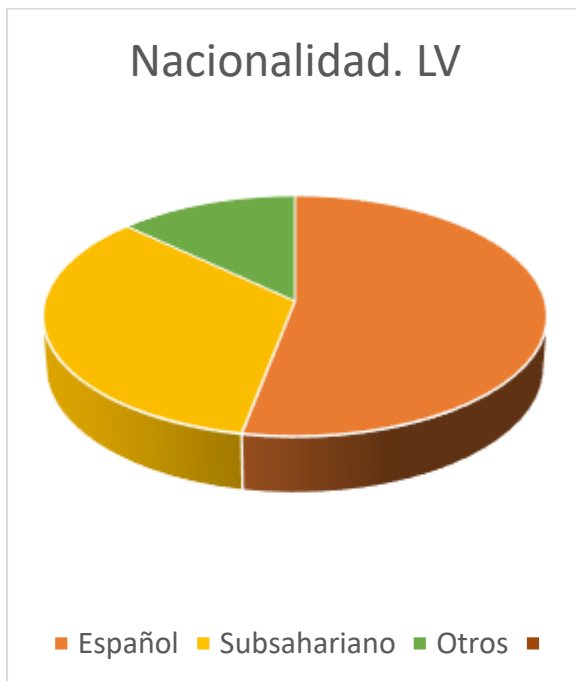


Figura 25. Proporciones de nacionalidades en los grupos LV y NLV.

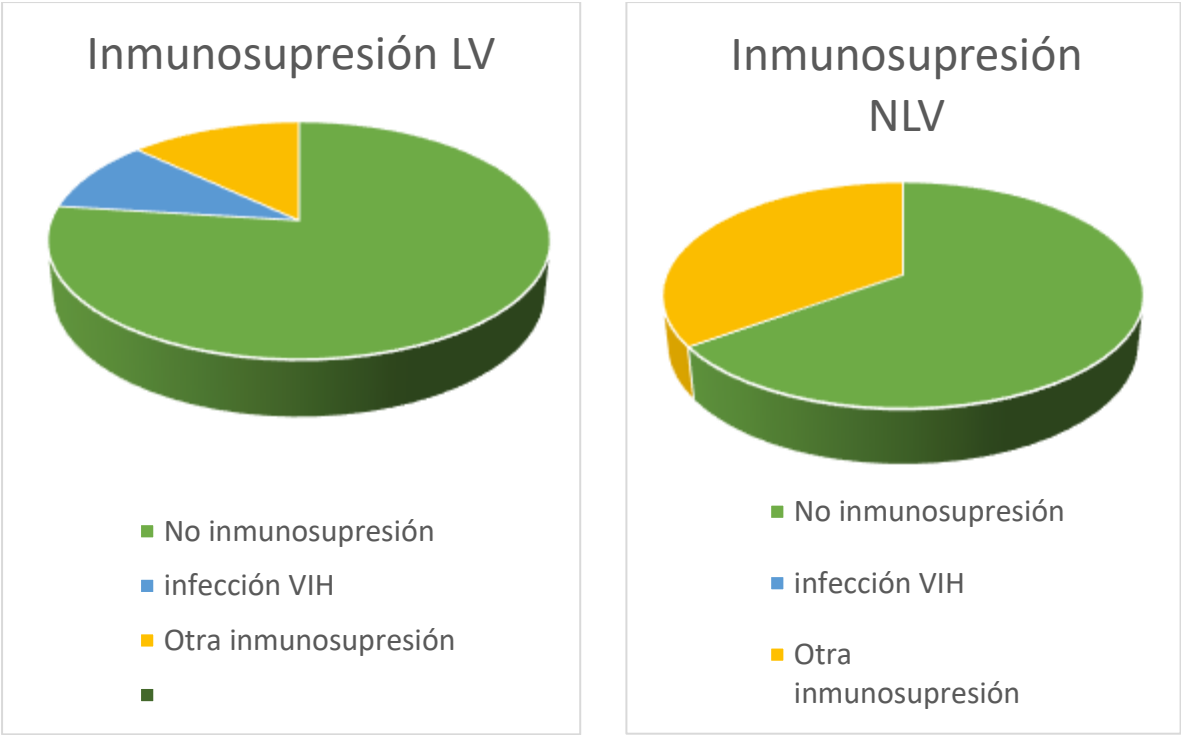


Figura 26. Proporciones de factores de inmunosupresión en los grupos LV y NLV.

6.1.2. Resultados diagnósticos microbiológicos

Los resultados de sensibilidad, especificidad y tiempo de respuesta de las técnicas de diagnóstico microbiológico empleadas en los pacientes estudiados se recogen en la tabla 7, utilizando como estándar de referencia el diagnóstico final según los criterios OMS previamente reseñados. La sensibilidad diagnóstica del aspirado de médula ósea para la leishmaniasis alcanzó un 48% en nuestra serie, siendo también baja para la prueba rápida rK39 utilizada en nuestro medio, aunque ambas pruebas mostraron muy alta especificidad y el resultado estaba disponible en el día. Las pruebas de ELISA y PCR en médula ósea tuvieron alta sensibilidad y especificidad, pero los resultados se retrasaban alrededor de 1 semana. La PCR no alcanzó una sensibilidad del 100%, detectándose 2 casos con PCR negativa en los que se observó el parásito en la médula ósea, y en 3 casos con ELISA positivo, ninguno de los cuales presentaba factores de inmunodepresión.

Tabla 7. Sensibilidad, especificidad y tiempo de respuesta de las pruebas diagnósticas de leishmaniasis visceral en el Hospital Universitario de Fuenlabrada (período 2013-2014)

Prueba diagnóstica	Sensibilidad	Especificidad	Tiempo de respuesta en días Mediana (P25-P75)
rK39	51%	97%	1
ELISA	94%	86%	6 (3-8)
PCR (MO)	94%	100%	9 (6-11)
Observación directa (MO) *	48%	100%	1

*Período 2009-2014

6.1.3. Resultados analíticos

Se han descrito y comparado entre los grupos de pacientes NLV, LV y SMD los resultados analíticos (bioquímica sérica, hemograma y aspirado de médula ósea) recogidos durante el período 2009-2014.

6.1.3.1. Resultados bioquímicos

Al valorar las frecuencias con las que se superaban los rangos de normalidad en los parámetros bioquímicos, se observaron algunas diferencias entre los grupos de no leishmaniasis visceral, leishmaniasis visceral y síndrome mielodisplásico (tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias de los parámetros bioquímicos que superan el límite superior de normalidad, en los grupos NLV, LV y SMD (período 2009-2014)

Parámetros de bioquímica sérica	NLV (%) (n=20) *	LV (%) (n=79) *	SMD (%) (n=50) *
IGG > 16 g/L	23.52 (n=17)	47.36 (n=57)	14.81 (n=27)
IgA > 4 g/L	23.52 (n=17)	8.77 (n=57)	7.40 (n=27)
IgM > 2.3 g/L	11.76 (n=17)	12.28 (n=57)	11.11 (n=27)
CR > 103 µmol/L	20	8.86	16
FA > 120 u/L	30 (n=20)	24.35 (n=78)	8 (n=50)
BT > 20.5 µmol/L	15	13.92	30
GGT > 85 u/L	40	44.30	2
ALT > 44 u/L	40	46.83	6
AST > 40 u/L	42.1 (n=19)	60.25 (n=78)	10 (n=50)
LDH > 250 u/L	25 (n=20)	75 (n=80)	18.75 (n=48)
TG > 1.7 nmol/L	30 (n=20)	59.74 (n=77)	18.75 (n=48)
FER > 250 µg/L	53.33 (n=15)	92 (n=75)	52.08 (n=48)
CRP > 5 mg/L	84.21 (n=19)	96.15 (n=78)	61.53 (n=39)

* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

Cuando se compararon los grupos LV y NLV respecto a los parámetros bioquímicos, IgA (no indicada en la tabla), ALT, fosfatasa alcalina, GGT, creatinina y bilirrubina total no mostraron diferencias significativas. Los parámetros bioquímicos séricos que aumentaron significativamente en los pacientes LV fueron triglicéridos, CRP, IgG, IgM, AST, LDH y ferritina (tabla 9).

Tabla 9. Parámetros bioquímicos (comparación LV y NLV, período 2009-2014).

<i>Distribuciones normales</i>			
Parámetros de bioquímica sérica	LV (n=79) * Media±desviación estándar	NLV (n=20) * Media±desviación estándar	p-valor
CRP (mg/L)	102.1± 68.9 (n=76)	65.2±65.7 (n=19)	0.03
<i>Distribuciones no normales</i>			
Parámetros de bioquímica sérica	LV (n=79) * Mediana (P25-P75)	NLV (n=20) * Mediana (P25-P75)	p-valor
TG (nmol/L)	2.09 (1.57-2.52) (n=75)	1.12 (0.57-1.86) (n=20)	<0.01
IgG (g/L)	15.90 (13.46-23.00) (n=57)	10.70 (7.65-16.24) (n=17)	<0.01
IgM (g/L)	1.43 (0.91-1.96) (n=57)	0.87 (0.69-1.17) (n=17)	0.02
AST (u/L)	65.5 (35-106.5) (n=76)	25 (17.5-79.75) (n=19)	<0.01
ALT (u/L)	44 (24.2-104)	30.5 (17.0-77.5)	0.13
LDH (u/L)	433 (255-709) (n=78)	199 (150-256)	<0.01
FER (µg/L)	2231 (1024-5327) (n=73)	222 (115-630) (n=15)	<0.01
FA (u/L)	86.5 (67-125) (n=78)	81.5 (67-128)	0.84
GGT (u/L)	66 (38-175)	55.5 (28.5-190)	0.63
CR (µmol/L)	74.2 (61,8-86.3)	69.4 (62.3-81.3)	0.64
BT (µmol/L)	11.1 (8.1-16.1)	11.3 (6.9-13.1)	0.64

* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

Cuando se compararon los parámetros bioquímicos entre el grupo LV y el grupo SMD, se detectaron, al igual que en la comparación previa, diferencias significativas en CRP, triglicéridos, IgG, AST, LDH y ferritina, todos estos parámetros más elevados en los casos de LV. También se encontraron diferencias significativas en ALT, fosfatasa alcalina y GGT, más elevados en el grupo de LV (tabla 10).

Tabla 10 Parámetros bioquímicos (comparación LV y SMD, período 2009-2014).

<i>Distribuciones no normales</i>			
Parámetros de bioquímica sérica	LV (n=79) * Mediana (P25-P75)	SMD (n=50) * Mediana (P25-P75)	p-valor
CRP (mg/L)	97.5 (40.5-135.3) (n=76)	7,0 (2.4-23.6) (n = 39)	< 0.01
TG (nmol/L)	2.09 (1.57-2.52) (n=75)	1.03 (0.84-1.52) (n=48)	< 0.01
IgG (g/L)	15.90 (13.46-23.00) (n=57)	10,70 (8.44-13.88) (n = 27)	< 0.01
IgM (g/L)	1.43 (0.91-1.96) (n=57)	1,13 (0.80-1.47) (n = 27)	0.13
ALT (u/L)	44 (24.2-104)	16,5 (11-28)	< 0.01
AST (u/L)	65.5 (35-106.5) (n=76)	19 (16-26)	< 0.01
LDH (u/L)	433 (255-709) (n=78)	190 (166-253) (n = 48)	< 0.01
FER (µg/L)	2231 (1024-5327) (n=73)	297 (121-803) (n = 48)	< 0.01
FA (u/L)	86.5 (67-125) (n=78)	73 (56-91)	< 0.01
GGT (u/L)	66 (38-175)	22,5 (17-41)	< 0.01
CR (µmol/L)	74.2 (61,8-86.3)	74.6 (64.5-92.8)	0.3
BT (µmol/L)	11.1 (8.1-16.1)	13.7 (9.5-21.7)	0.06

* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

Los principales hallazgos bioquímicos se resumen en las figuras 27, 28, 29 y 30.

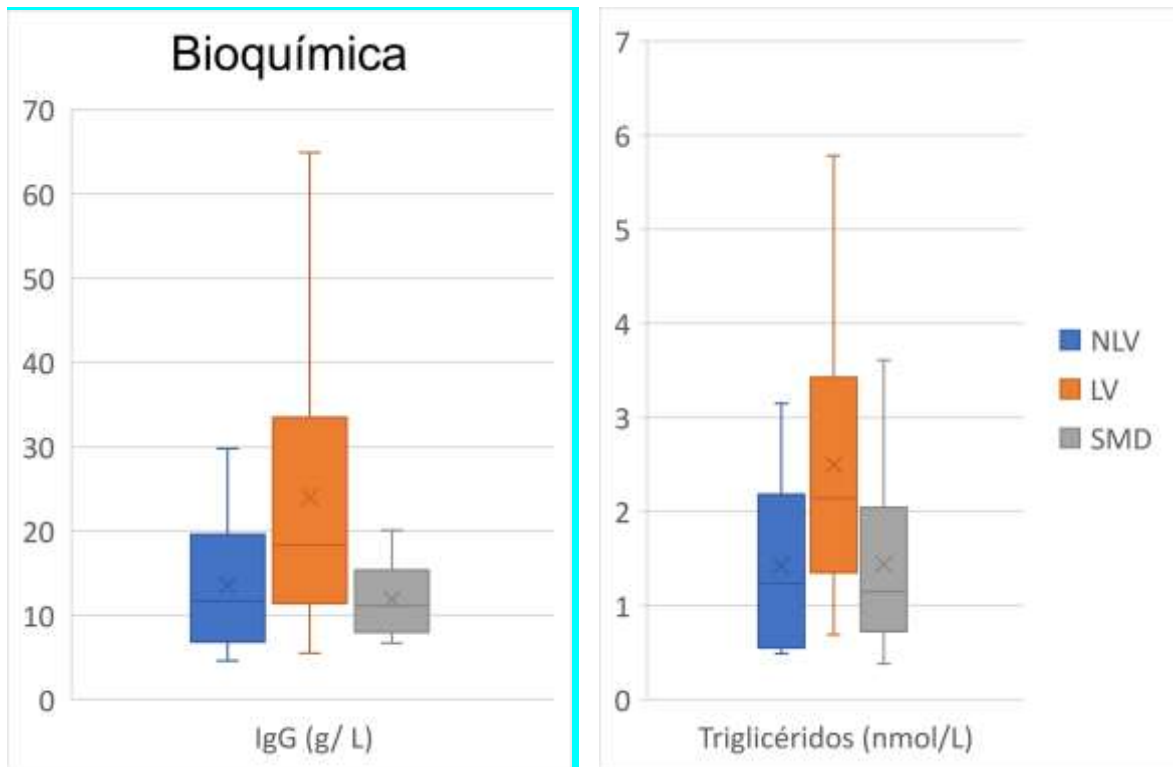


Figura 27 Diagrama de cajas comparando IgG y triglicéridos entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

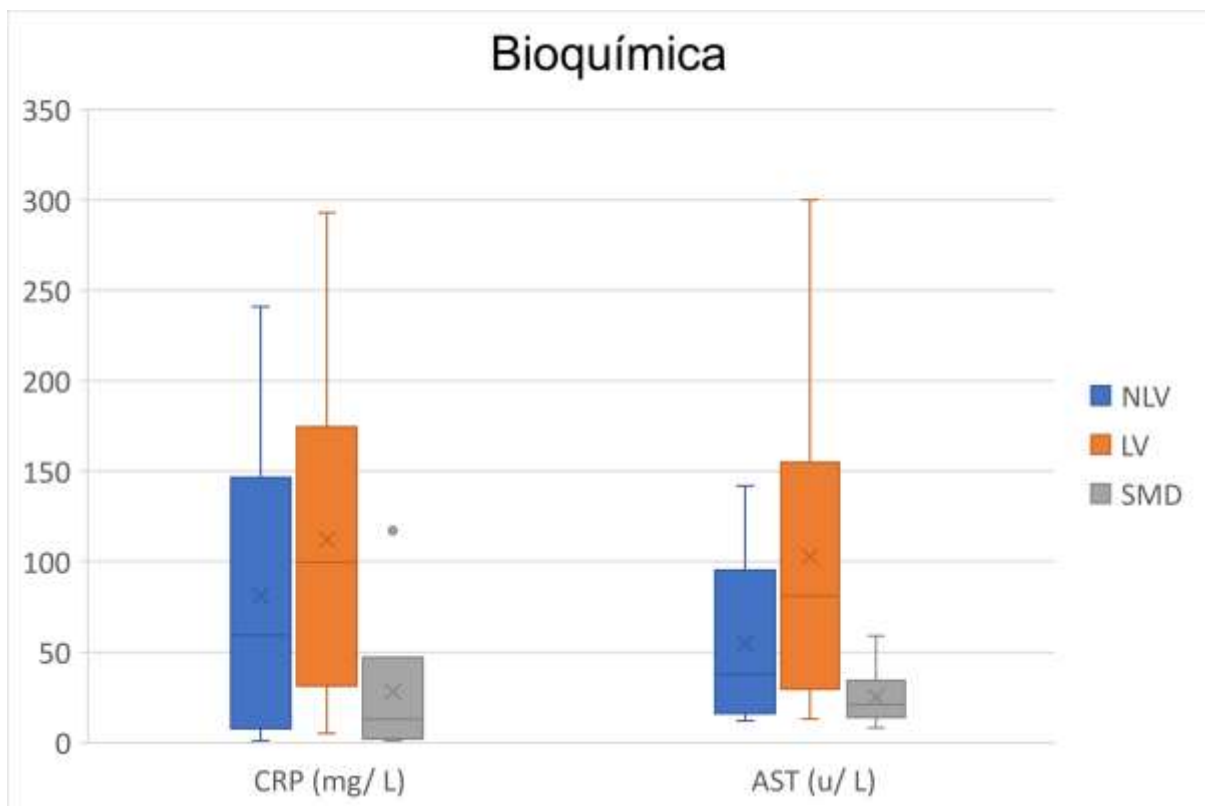


Figura 28. Diagrama de cajas comparando CRP y AST entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

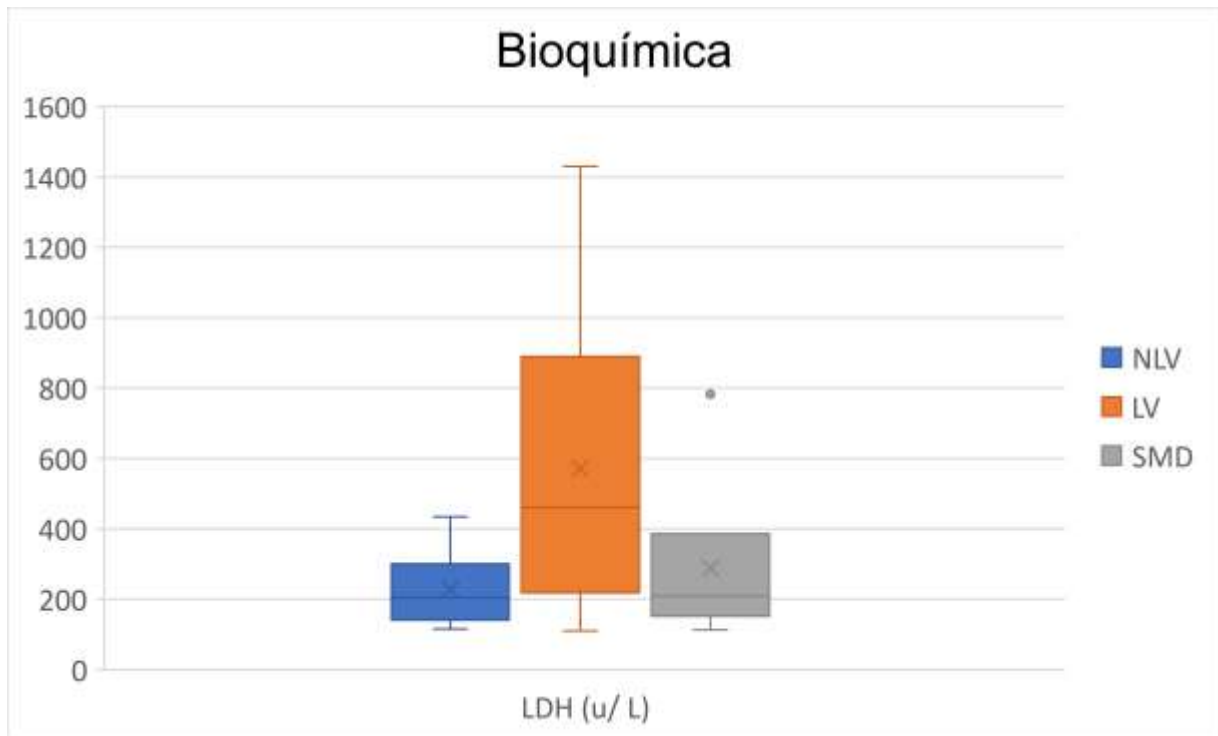


Figura 29. Diagrama de cajas comparando LDH entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

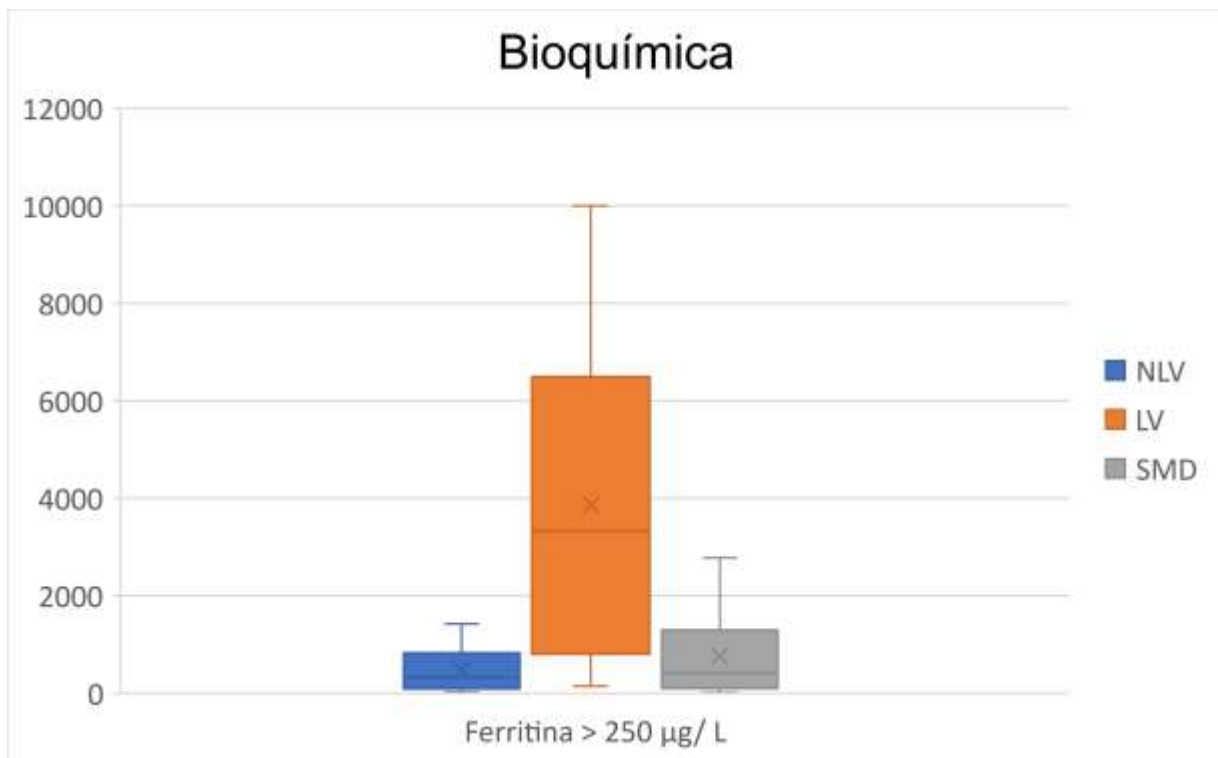


Figura 30. Diagrama de cajas comparando LDH entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

6.1.3.2. Resultados del hemograma, morfología sanguínea y VSG

En la valoración de las frecuencias con las que se presentan resultados anormales en los parámetros del hemograma, se observaron algunas diferencias entre los grupos de no leishmaniasis visceral, leishmaniasis visceral y síndrome mielodisplásico (tabla 11).

Tabla 11. Frecuencias de los parámetros anormales[#] en los grupos no leishmaniasis visceral, leishmaniasis visceral y síndrome mielodisplásico (período 2009-2014).

Recuentos sanguíneos (hemograma)	NLV (%) n=20 *	LV (%) n=79 *	SMD (%) n=50 *
Hemoglobina < 120 g/L	55	93.30	80
VCM > 98 fL	0	0	20
ADE > 15%	30	37.97	74
Reticulocitos > 100 x 10 ⁹ /L	0 (n=13)	21.81 (n=55)	12.5 (n=48)
Plaquetas < 150 x 10 ⁹ /L	40	92.40	58
Leucocitos < 4 x 10 ⁹ /L	20	96.20	42
Pancitopenia	0	84.81	22
Neutrófilos < 1.5 x 10 ⁹ /L	20	62.02	36
Linfocitos < 1.0 x 10 ⁹ /L	15	49.36	16
Monocitos > 0.8 x 10 ⁹ /L	10	1.26	36
Eosinófilos > 0.5 x 10 ⁹ /L	0	0	0
VSG > 30 mm 1 ^a hora	64.28 (n=14)	81.25 (n=46)	70.58 (n=17)

* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

[#] Se indica la frecuencia de los casos que están por debajo del límite inferior de normalidad en la mayoría de los parámetros, excepto en VCM, reticulocitos, monocitos y VSG, en los que se indica la frecuencia de los casos que superan el límite superior de normalidad. Se indica también la frecuencia de pancitopenia (coincidencia de hemoglobina, leucocitos y plaquetas simultáneamente por debajo del límite normal).

En cuanto a los parámetros cualitativos de la morfología de sangre periférica, aunque algunos se presentaron con relativa frecuencia (refuerzo de granulación de neutrófilos en un 45% y linfocitos activados en un 30%), no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de LV y NLV cuando se compararon. Otras anomalías presentaron una frecuencia muy baja y no alcanzaron diferencias significativas en ningún caso. Las alteraciones morfológicas cualitativas finalmente evaluadas fueron: en serie blanca, además de las indicadas, presencia de linfocitos grandes granulares; en serie roja, presencia de eliptocitos, dianocitos, dacriocitos, acantocitos y esferocitos; y en serie plaquetaria, presencia de plaquetas grandes o dismórficas.

Se compararon los grupos de leishmaniasis visceral y no leishmaniasis visceral respecto a los recuentos sanguíneos. Los parámetros de hemograma que se encontraban significativamente más bajos en los pacientes con leishmaniasis visceral fueron la hemoglobina, las plaquetas, los leucocitos y los neutrófilos, linfocitos y eosinófilos, tanto en valores porcentuales como absolutos; en el caso de los monocitos sólo había diferencias en los valores absolutos. Los reticulocitos y el ancho de distribución eritrocitaria no mostraron diferencias significativas. Tampoco se encontró diferencia significativa en la VSG (tabla 12)

Tabla 12. Parámetros cuantitativos del hemograma (comparación LV y NLV, período 2009-2014).

<i>Distribuciones normales</i>			
Recuentos sanguíneos (hemograma)	LV (n=79) * Media±desviación estándar	NLV (n=20) * Media±desviación estándar	p-valor
Hemoglobina (g/L)	102.2±15.5	118.4±21.3	<0.01
VCM (fL)	83.2±7.5	86.2±7.1	0.03
Leucocitos x 10 ⁹ /L	2.6±0.9	6.9±4.6	<0.01
Monocitos %	9.6±4.3	10.1±5.2	0.74
Plaquetas x 10 ⁹ /L	98.8±41.7	218.1±136.0	<0.01
VSG (mm 1ª hora)	73.0±35.9 (n=46)	66.5±48.3 (n=14)	0.59
<i>Distribuciones no normales</i>			
Recuentos sanguíneos (hemograma)	LV (n=79) * Mediana (P25-P75)	NLV (n=20) * Mediana (P25-P75)	p-valor
ADE (%)	14.8(13.8-15.8)	14.5 (13.6-15.4)	0.27
Reticulocitos x 10 ⁹ /L	49.6 (31.0-90.0)	45.5 (33.2-57.5)	0.21
Eosinófilos %	0.3 (0.0-0.9)	1.9 (1.5-4.1)	<0.01
Linfocitos %	38.2(32.0-46.6)	26.8 (15.0-38.3)	<0.01
Neutrófilos %	51.1 (42.1-59.0)	59.5 (45.4-75.0)	0.04
Linfocitos x 10 ⁹ /L	0.9 (0.7-1.2)	1.5 (1.0-1.8)	<0.01
Monocitos x 10 ⁹ /L	0.2 (0.1-0.3)	0.5 (0.4-0.7)	<0.01
Neutrófilos x 10 ⁹ /L	1.3 (0.8-1.6)	2.9 (1.7-5.6)	<0.01
Eosinófilos x 10 ⁹ /L	0.01 (0-0.02)	0.16 (0.09-0.24)	<0.01

* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

Se compararon también los recuentos sanguíneos entre el grupo de leishmaniasis visceral y el grupo de síndromes mielodisplásicos. Se detectaron diferencias significativas en las plaquetas, leucocitos y valores absolutos de neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos, todos ellos con valores inferiores en el grupo LV. En los parámetros eritrocitarios no se

encontró diferencia en la tasa de hemoglobina ni en los reticulocitos, pero sí que existían diferencias significativas en el VCM y el ADE, menores en el grupo LV (tabla 13).

Tabla 13. Parámetros cuantitativos del hemograma (comparación LV y SMD, período 2009-2014).

<i>Distribuciones normales</i>			
Recuentos sanguíneos (hemograma)	LV (n=79) * Media±desviación estándar	SMD (n=50) * Media±desviación estándar	p-valor
Hemoglobina (g/L)	102.2±15.5	105.6±20.7	0.32
VCM (fL)	83.2±7.5	94.2±10.2	<0.01
Reticulocitos x 10 ⁹ /L	66.0±44.2	68.7±33.5	0.72
Leucocitos x 10 ⁹ /L	2.6±0.9	5.4±4.0	<0.01
Neutrófilos %	49.4±12.6	49.4±15.9	0.94
Linfocitos %	39.5±11.4	34.5±16.0	0.06
Monocitos %	9.6±4.3	13.3±8.2	<0.01
Linfocitos x 10 ⁹ /L	1.0±0.5	1.5±0.8	<0.01
Monocitos x 10 ⁹ /L	0.25±0.15	0.66±0.45	<0.01
Plaquetas x 10 ⁹ /L	98.8±41.7	173.6±158.4	<0.01
VSG (mm 1ª hora)	73.0±35.9 (n=46)	53.7±32.2 (n=17)	0.04
<i>Distribuciones no normales</i>			
Recuentos sanguíneos (hemograma)	LV (n=79) * Mediana (P25-P75)	SMD (n=50) * Mediana (P25-P75)	p-valor
ADE (%)	14.8(13.8-15.8)	17.3 (14.7-20.1)	<0.01
Eosinófilos %	0.3 (0.0-0.9)	1.3 (0-3.2)	0.20
Neutrófilos x 10 ⁹ /L	1.3 (0.8-1.6)	2.1 (1.2-3.8)	<0.01
Eosinófilos x 10 ⁹ /L	0.01 (0-0.02)	0.1 (0-0.1)	<0.01

* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

Se resumen los principales hallazgos del hemograma y la VSG en las figuras 31, 32, 33 y 34.

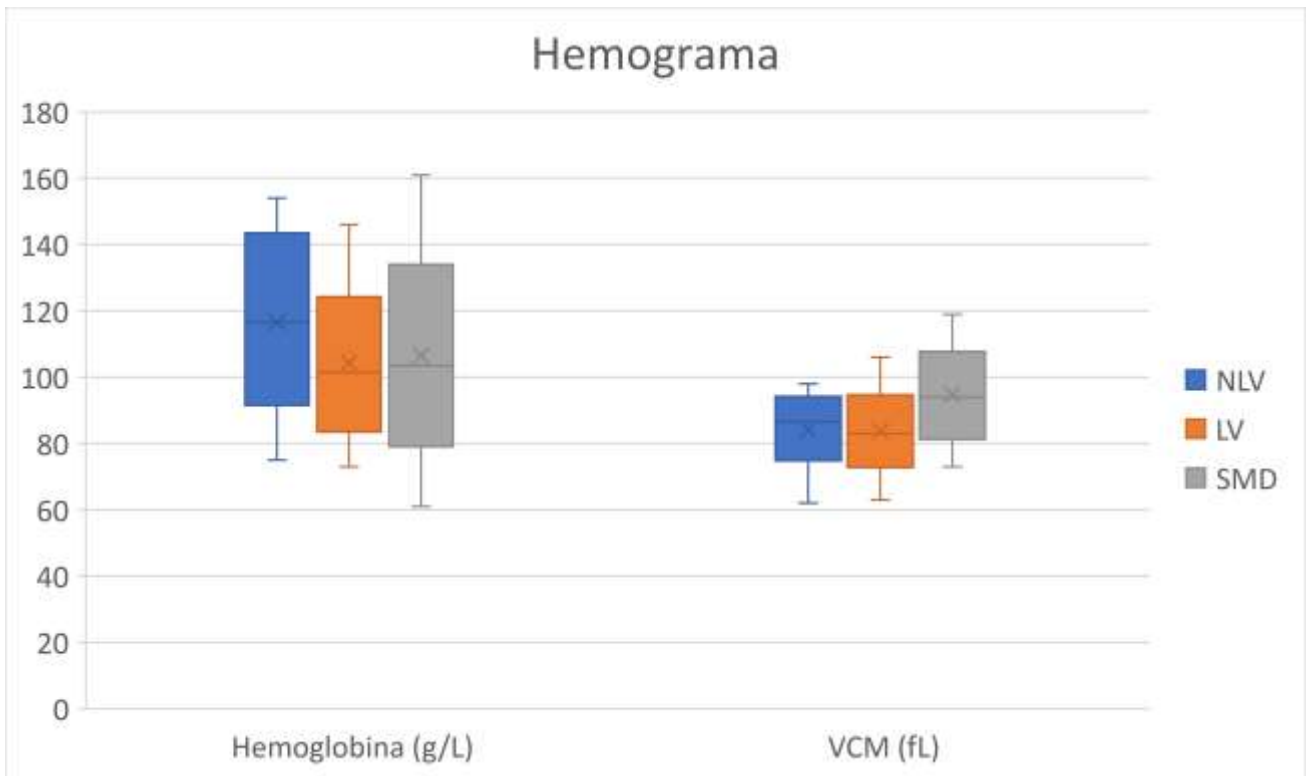


Figura 31. Diagramas de cajas comparando hemoglobina y VCM entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

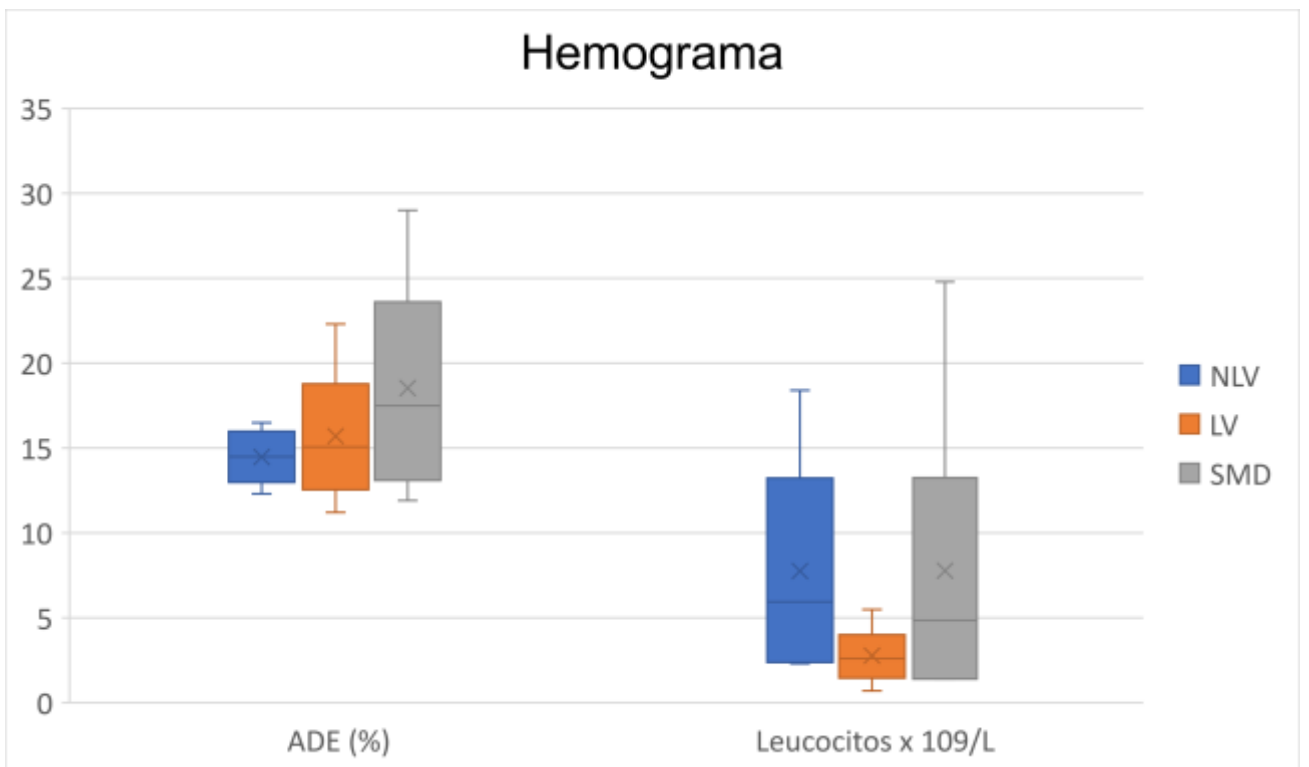


Figura 32. Diagramas de cajas comparando ADE y leucocitos entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

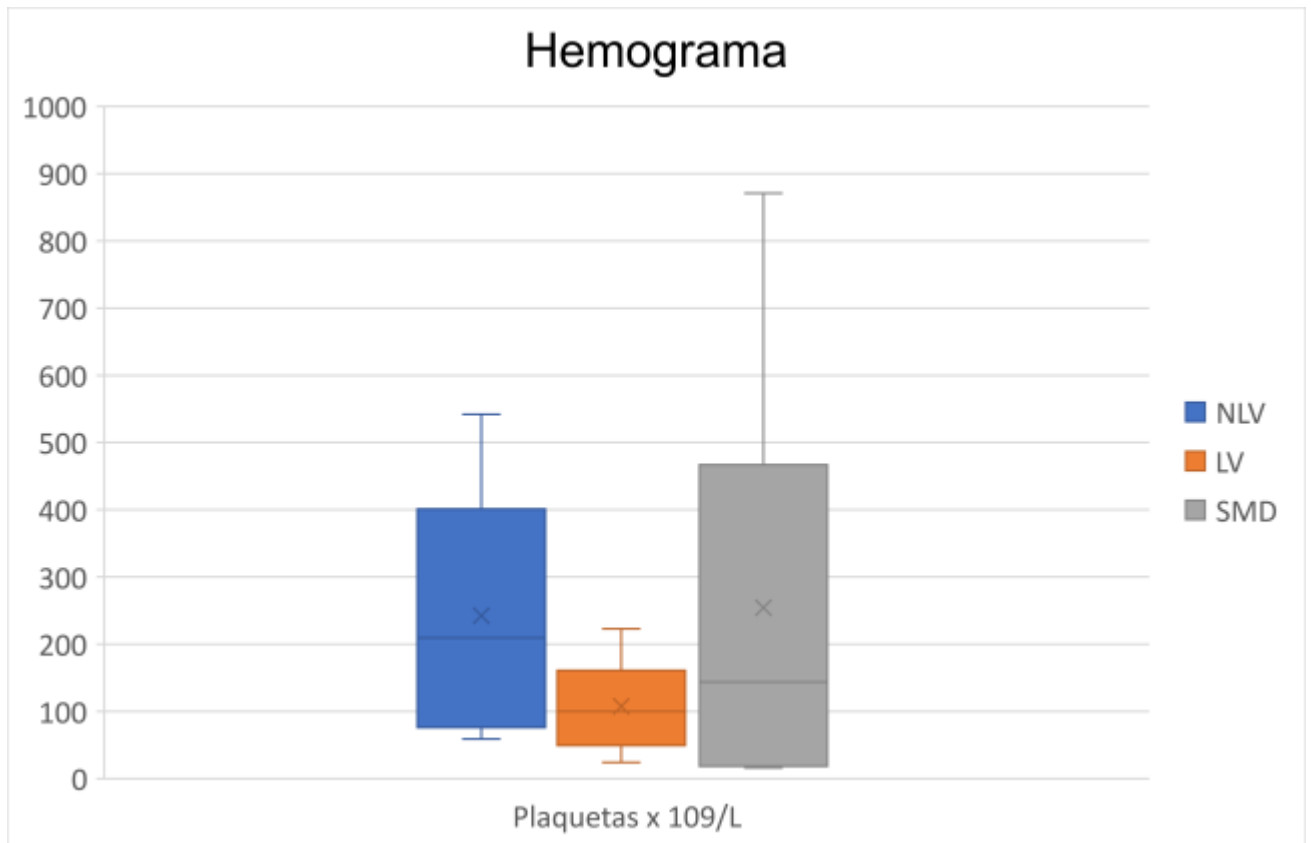


Figura 33. Diagrama de cajas comparando plaquetas entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

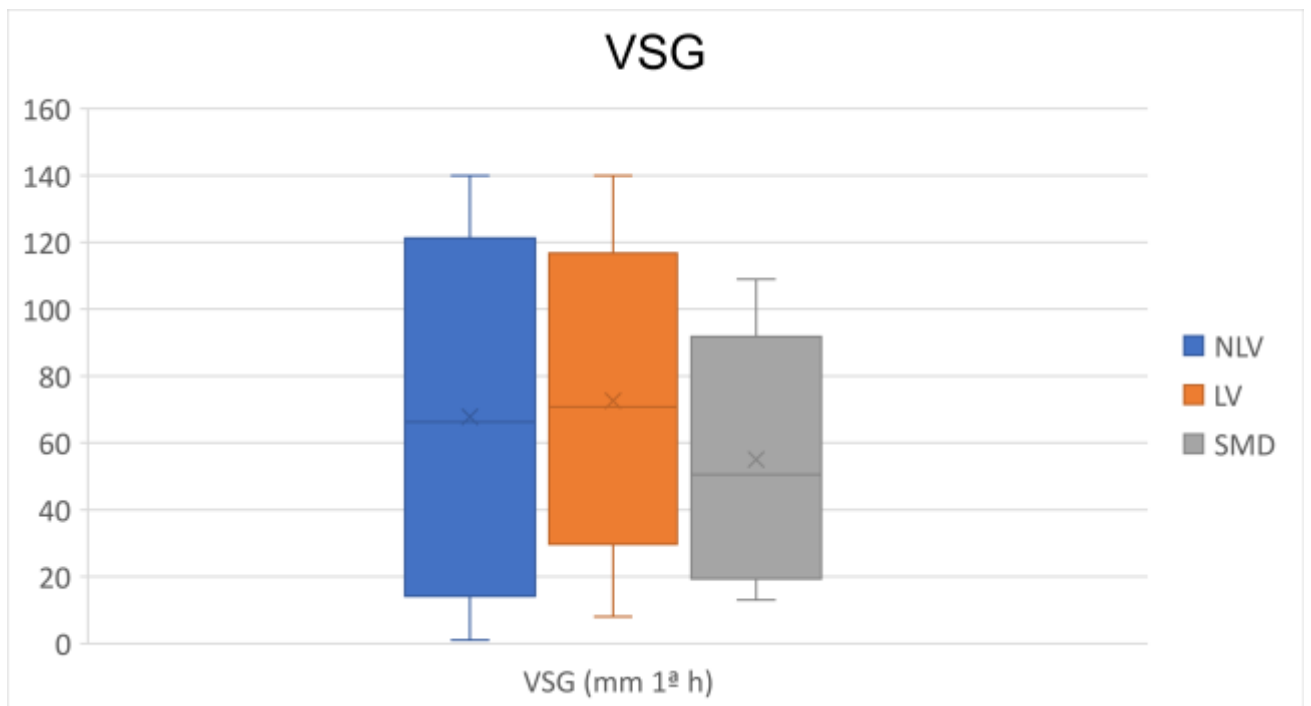


Figura 34. Diagrama de cajas comparando VSG entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

6.1.3.3. Resultados en médula ósea

Al valorar las frecuencias con las que se presentan resultados anormales en los parámetros de médula ósea, se observaron algunas diferencias entre los grupos de no leishmaniasis visceral, leishmaniasis visceral y síndrome mielodisplásico (tabla 14).

Tabla 14. Frecuencias de los parámetros anormales[#] en los grupos NLV, LV y SMD (período 2009-2014).

Médula ósea	NLV (%) n=20 *	LV (%) n=79 *	SMD (%) n=50 *
Celularidad > 3/5	70	88 (n=76)	86
Serie mieloide < 52%	35	82.27	62
Serie eritroide > 35%	25	56.96	54
Ratio mielo-eritroide < 1.5	30	70.88	56
Células plasmáticas ≥ 2%	40	92.4	32
Macrófagos ≥ 1%	25	69.62	22
Eosinofilos ≥ 5%	20	24.05	8
Monocitos ≥ 1%	10	22.78	52
Blastos ≥ 2%	15	18.98	62
Linfocitos ≥ 15%	5	11.39	10
Megacariocitos cuantitativos > 3/5	35	69.62	52
Parámetros cualitativos			
Hemofagocitosis	45	51.89 (6.32 intensa)	12
Hemofagocitosis de eritrocitos	40	44.30	12
Hemofagocitosis de leucocitos y plaquetas	5	21.51	4
Diseritropoyesis	30 (5 **)	34.17 (8.86 **)	86 **
Dismegacariopoyesis	0	13.92	92
Disgranulopoyesis	0	3.79	66
Megaloblastosis	0	8.86	NR

*n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

** diseritropoyesis en > 10% de los eritroblastos. NR: dato no recogido.

[#] Se indica la frecuencia de los casos que sobrepasan el límite superior de normalidad en la mayoría de los parámetros, excepto en los parámetros serie mieloide y relación mielo-eritroide en los que se indica la frecuencia de los casos que están por debajo del límite inferior de normalidad. En los parámetros cualitativos, se indica la frecuencia de los casos en los que aparecen, teniendo en cuenta que su presencia es siempre anormal, aunque en el caso de la diseritropoyesis se indica también cuando supera el 10%, que es el límite que se considera significativo en los criterios de síndrome mielodisplásico.[94]

Cuando se realizó la comparación entre el grupo de leishmaniasis visceral y el grupo de no leishmaniasis visceral (tabla 15), se encontró que los pacientes del grupo de leishmaniasis visceral presentaban una celularidad más aumentada y una proporción significativamente mayor de serie eritroide, células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos y megacariocitos cuantitativos en relación con el grupo de leishmaniasis no visceral (figuras 36 y 37). En el grupo de la leishmaniasis visceral también se encontraron valores más bajos de la serie mieloide y de la relación mielo-eritroide. Otros parámetros evaluados como las proporciones de linfocitos y blastos no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos.

Tabla 15. Parámetros cuantitativos en médula ósea (comparación LV y NLV, período 2009-2014).

Distribuciones normales			
Parámetros medulares	LV (n=79) * Media±desviación estándar	NLV (n=20) * Media±desviación estándar	p-valor
Serie mieloide %	42.08±10.49	56.03±10.15	<0.01
Serie eritroide %	37.50±10.95	29.35±11.98	<0.01
Blastos %	1.25±0.84	0.90±0.83	0.10
Distribuciones no normales			
Parámetros medulares	LV (n=79) * Mediana (P25-P75)	NLV (n=20) * Mediana (P25-P75)	p-valor
Ratio mielo-eritroide	1.23 (0.81-1.61)	2.12 (1.25-3.20)	<0.01
Células plasmáticas %	6.18±3.92	2.37±1.82	<0.01
Macrófagos %	1.1 (0.5-2.5)	0.5 (0.5-0.75)	<0.01
Megacariocitos cuantitativos (rango 0-5)	4.0 (3.0-4.0) (n=78)	3.0 (3.0-4.0) (n=17)	0.02
Celularidad (rango 0-5)	4.0 (3.5-4.0) (n=76)	3.5 (3.0-4.0)	0.03
Eosinófilos %	3 (1.5-4.5)	4.9 (3.0-7.0)	<0.01
Linfocitos %	8.5 (6.0-11.5)	6.75 (4.25-9.25)	0.07

* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

También se detectaron cambios cualitativos más frecuentes en el grupo de la leishmaniasis visceral, aunque las diferencias no fueron significativas. Los parámetros diferenciales detectados fueron la desviación a la izquierda de la serie mieloide, la presencia de macrófagos espumosos y los fenómenos de **hemofagocitosis** (figuras 35, 36 y 37), que presentaron 41 pacientes (más del 50%) en el grupo de LV. Cinco pacientes presentaron una intensa hemofagocitosis, todos ellos en el grupo de leishmaniasis visceral. La fagocitosis de las células eritroides fue similar en los grupos leishmaniasis visceral y no leishmaniasis visceral, mientras que la fagocitosis de plaquetas y leucocitos fue más frecuente (20,98% frente al 5%, $p = 0,04$) en el grupo de leishmaniasis visceral. Si se aplican a esos pacientes los criterios HLH (linfocitosis hemofagocítica), se observa que el 11.4 % (9/79) de los pacientes del grupo LV los cumplen, frente al ninguno de los pacientes del grupo NLV; todos estos pacientes HLH cumplían el criterio de presencia de hemofagocitosis en médula ósea.

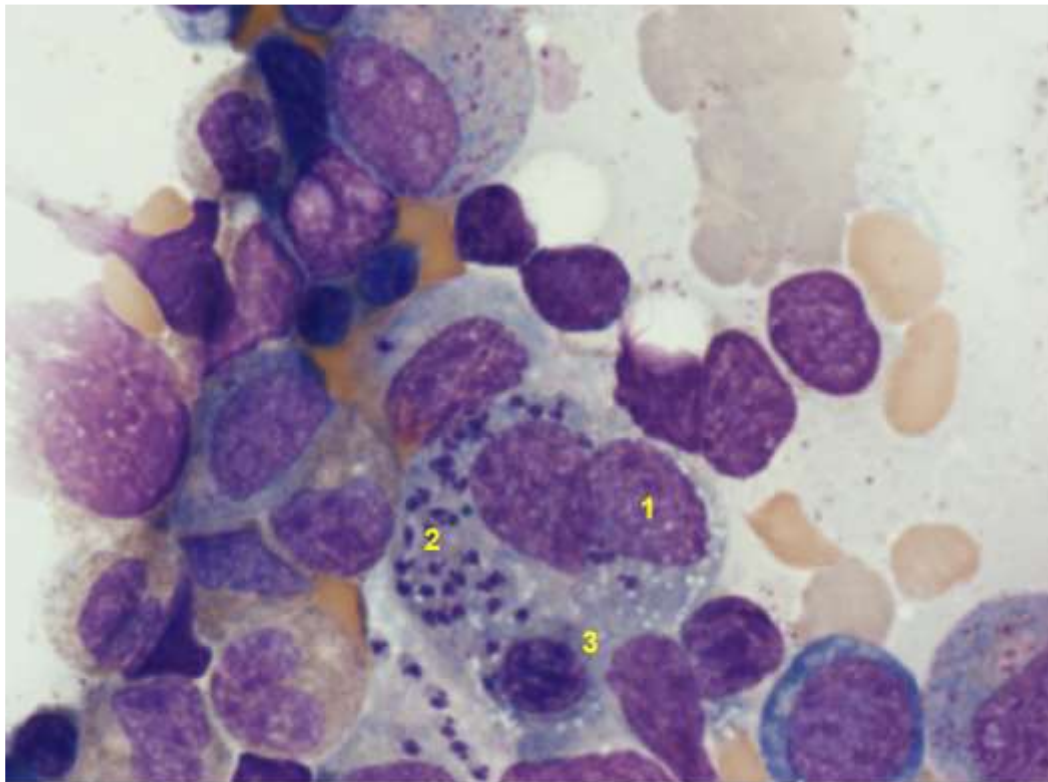


Figura 35. Macrófago (1) que ha fagocitado amastigotes de *Leishmania* (2) y un eritroblasto (3) (médula ósea, tinción Wright, X1.000, foto del autor).

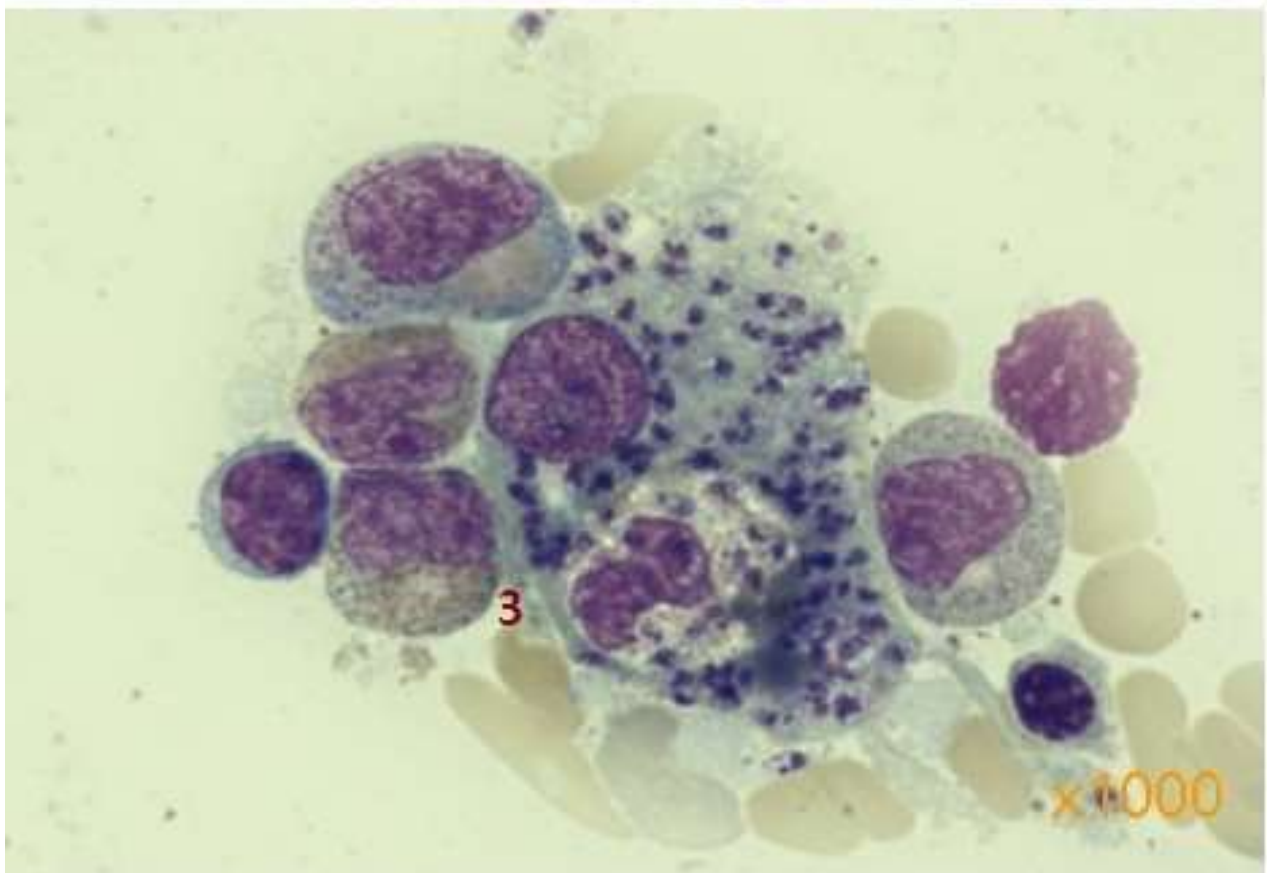
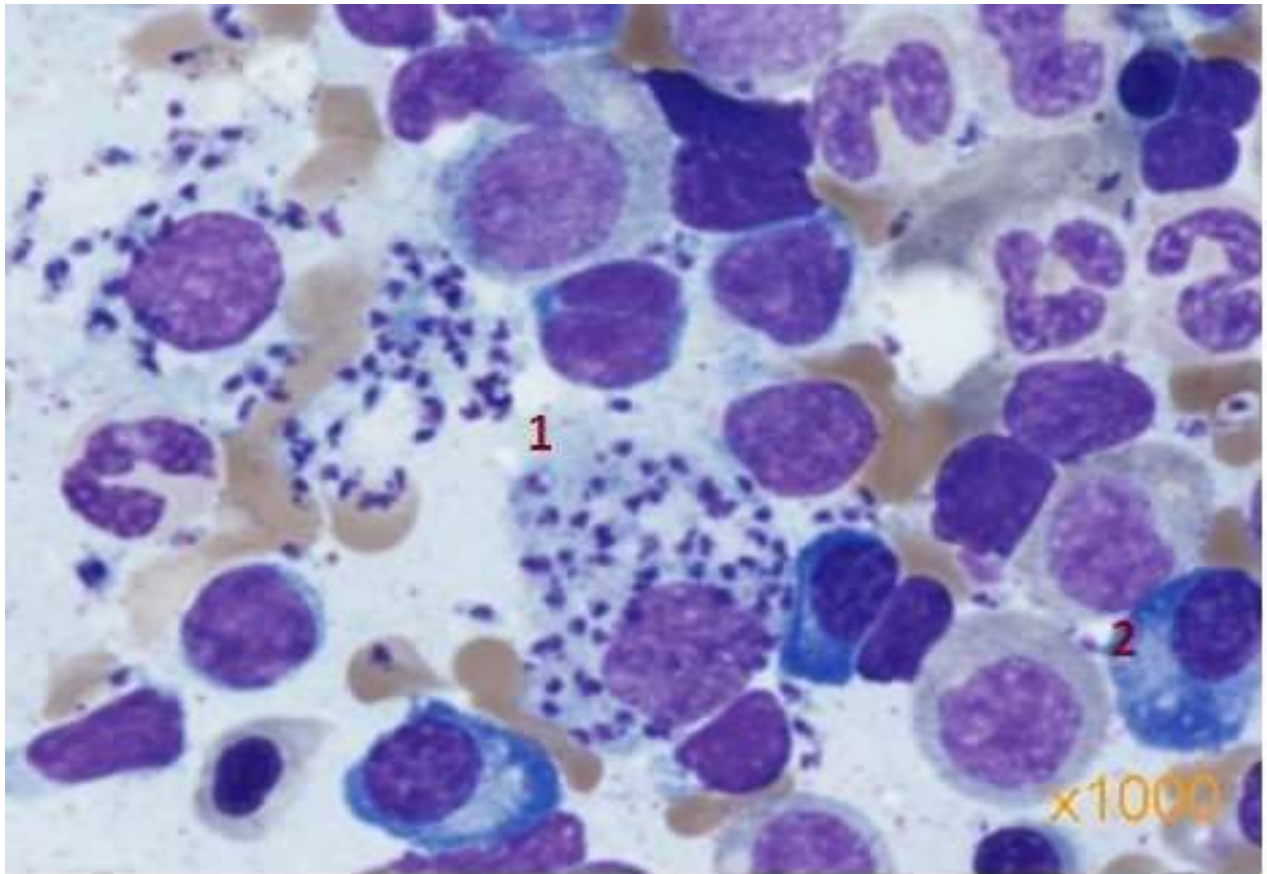


Figura 36. Amastigotes de *Leishmania* (1), plasmacitosis (2) y hemofagocitosis (3) observados en aspirados de médula ósea (tinción de Wright x 1000, foto del autor).

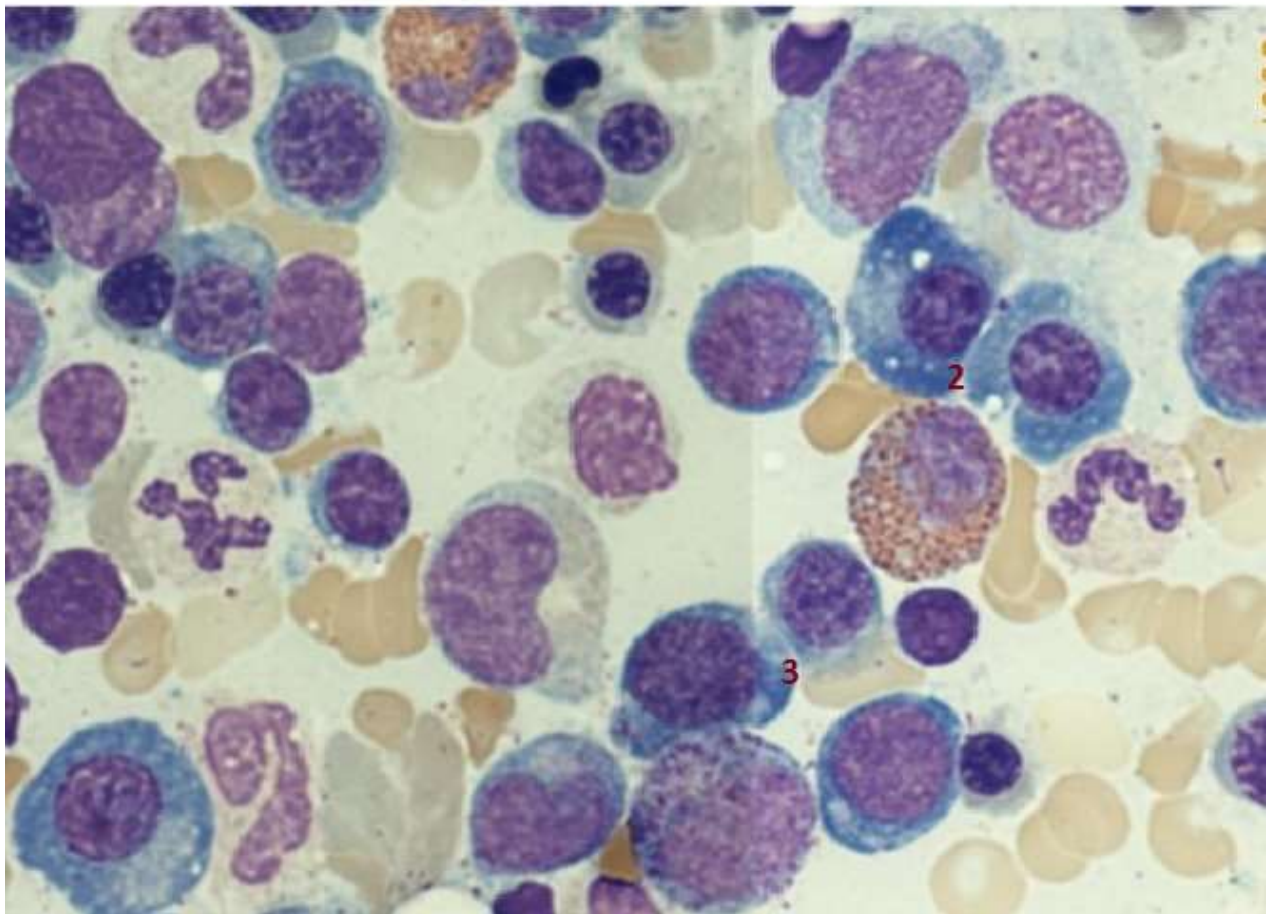
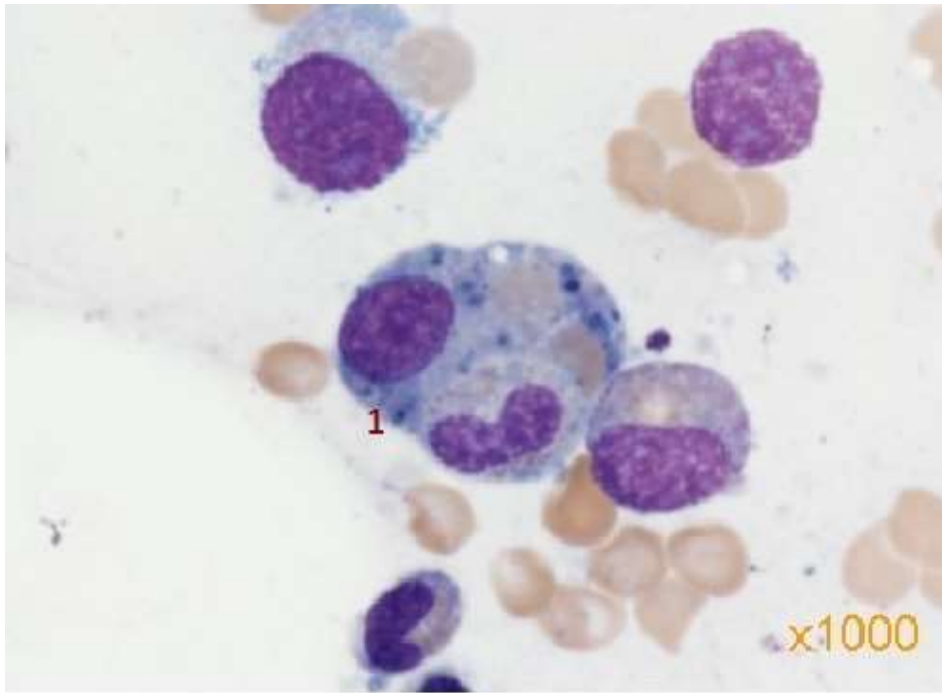


Figura 37. Aspirados de médula ósea de leishmaniasis visceral documentada en los que los amastigotes no se observaron. Hemofagocitosis (1), plasmacitosis (2) e hiperplasia eritroide están también presentes (tinción de Wright x 1000, foto del autor).

Se compararon también los parámetros cuantitativos en la médula ósea entre el grupo de leishmaniasis visceral y el grupo de síndrome mielodisplásico. Se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de células plasmáticas, blastos y macrófagos. No se encontraron diferencias en los porcentajes de las series mieloide y eritroide (tabla 16)

Tabla 16. Parámetros cuantitativos en médula ósea (comparación LV y SMD, período 2009-2014)

<i>Distribuciones normales</i>			
Parámetros medulares	LV (n=79) * Media±desviación estándar	SMD (n=50) * Media±desviación estándar	p-valor
Serie mieloide %	42.08±10.49	46.11±16.19	0.76
Serie eritroide %	37.50±10.95	37.85±17.38	0.56
Células plasmáticas %	6.19±3.92	1.38±1.16	<0.01
<i>Distribuciones no normales</i>			
Parámetros medulares	LV (n=79) * Mediana (P25-P75)	SMD (n=50) * Mediana (P25-P75)	p-valor
Ratio mielo-eritroide	1.23 (0.81-1.55)	1.31 (0.74-2.24)	0.41
Macrófagos %	1.0 (0.5-2.5)	0.25(0-0.5)	<0.01
Megacariocitos cuantitativo (rango 0-5)	4.0 (3.0-4.0) (n=78)	4.0 (3.0-4.0)	0.03
Celularidad (rango 0-5)	4.0 (3.5-4.0) (n=76)	4.0 (3.5-4.5)	0.03
Eosinófilos %	3.0 (1.5-4.5)	1.5 (1.0-3.0)	0.2
Linfocitos %	8.5 (6.0-11.5)	8 (5-11.5)	0.06
Blastos%	1.0 (0.5-2.0)	2.5 (1.0-4.8)	<0.01
* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.			

Entre los parámetros cualitativos, todos los relacionados con displasia (diseritropoyesis, disgranulopoyesis y dismegacariopoyesis) resultaron significativamente más frecuentes en los pacientes con síndromes mielodisplásicos.

Se resumen los principales hallazgos medulares en las figuras 38, 39 y 40.

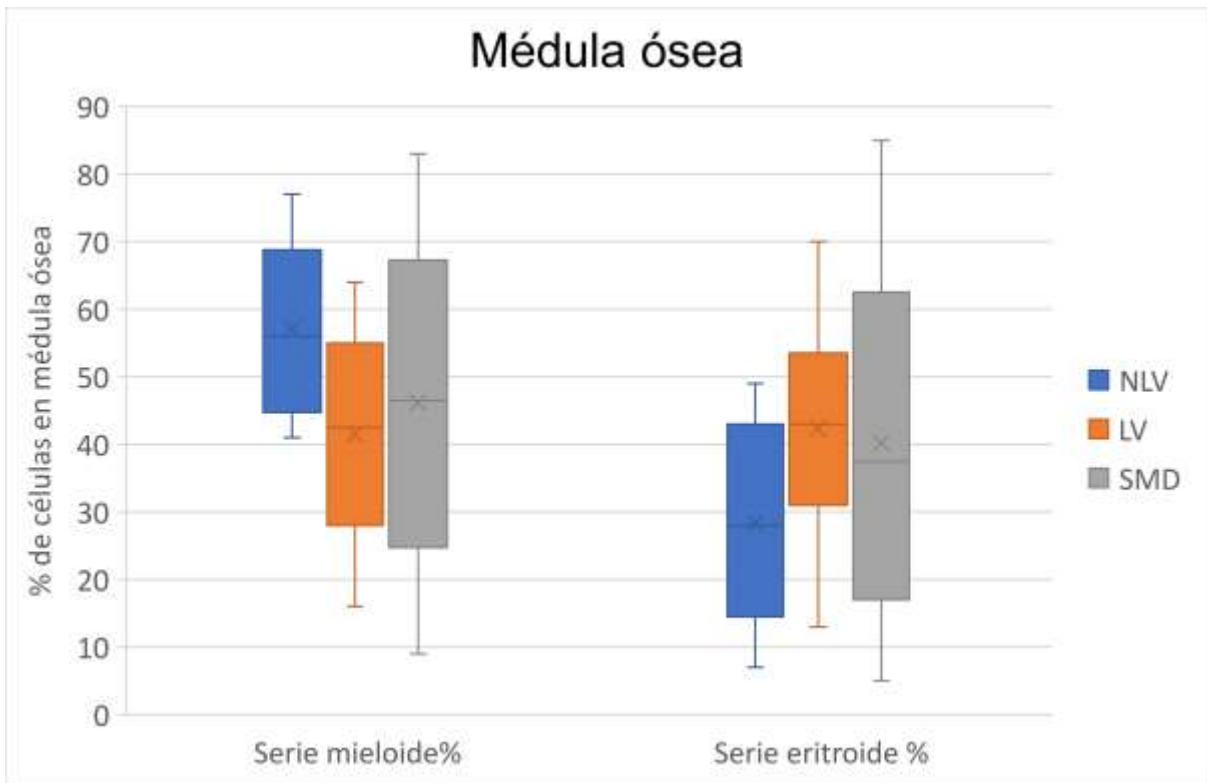


Figura 38. Diagramas de cajas comparando % de series mieloide y eritroide entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

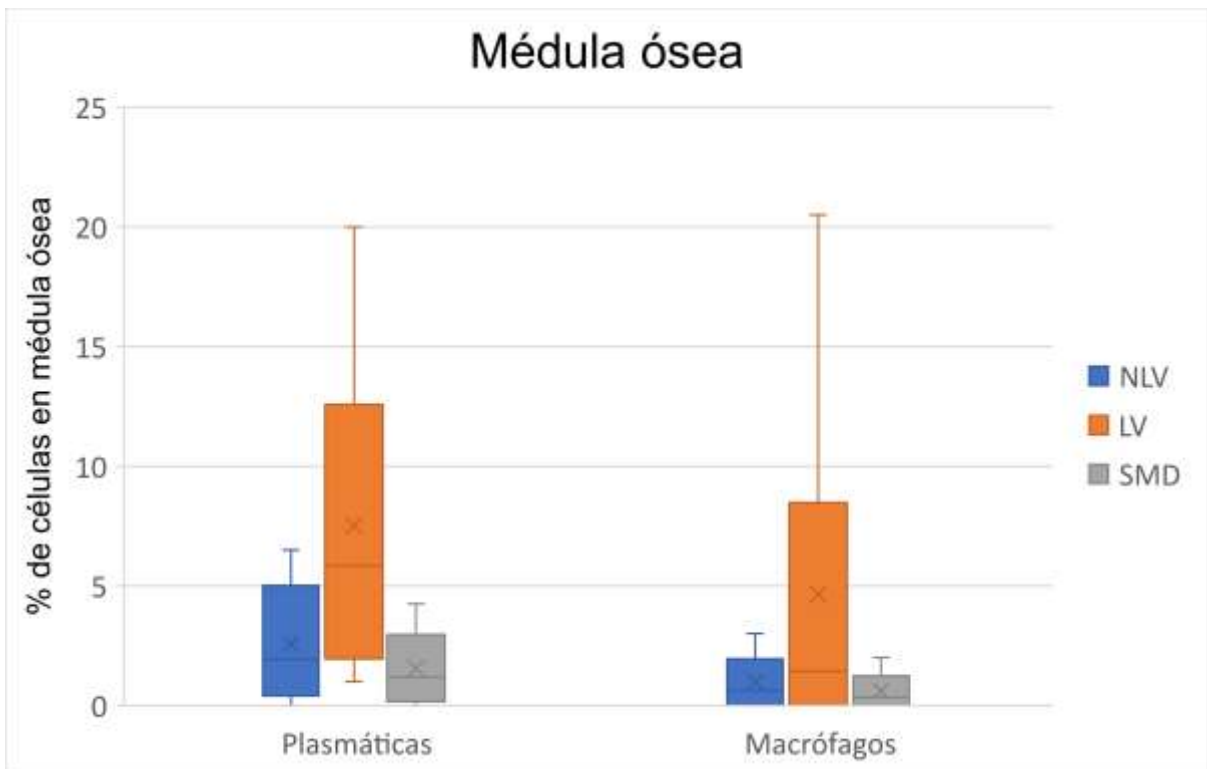


Figura 39. Diagramas de cajas comparando % de plasmáticas y macrófagos entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

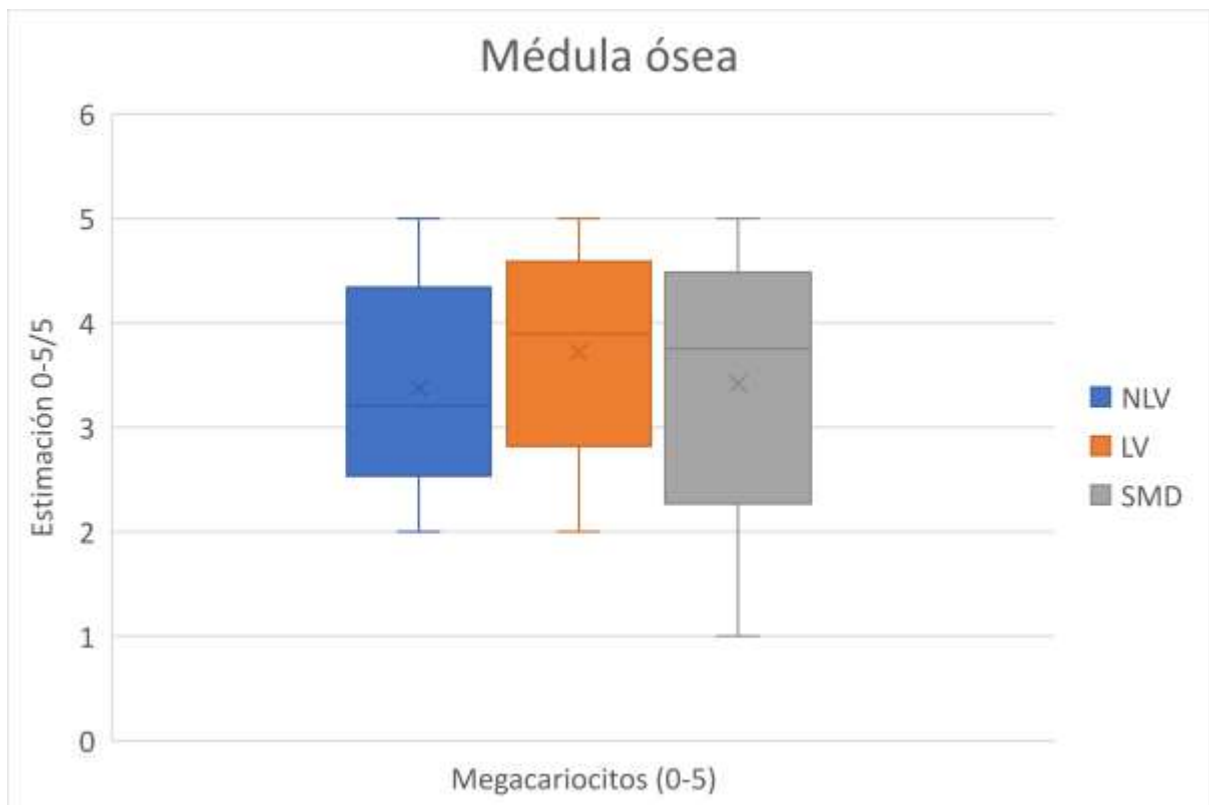


Figura 40. Diagramas de cajas comparando la cuantificación de megacariocitos entre los grupos NLV, LV y SMD (X marca la media y — la mediana).

6.1.3.4. Hierro en médula ósea

De los 122 pacientes estudiados de los grupos de leishmaniasis visceral y no leishmaniasis visceral en los períodos 2009-2014 y 2015-2017, se realizó tinción de Perls en el aspirado de médula ósea en 38 de ellos.

La estimación de los depósitos de hierro (rango 0-4) fue algo más elevada en los pacientes NLV frente a los pacientes con LV, en rangos discretamente por debajo del nivel considerado normal (2), pero sin encontrar que las diferencias fueran significativas, como vemos en la tabla 8.

Los patrones medulares del hierro más habituales en los 2 grupos son los de ferropenia y bloqueo macrofágico del hierro, característico este último de los procesos inflamatorios

crónicos. Sólo un paciente presentó patrón de sobrecarga férrica, uno de los casos de NLV. Al comparar los grupos de LV y NLV no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la distribución de esos patrones (tabla 17).

Tabla 17. Tinción de Perls en médula ósea, comparación entre LV y NLV, período 2009-2017.

	LV (n=26) Media±desviación estándar	NLV (n=12) Media±desviación estándar	p-valor (T-student)
Hierro macrofágico (rango 0-4)	1.32±1.26	1.95±1.30	0.17
Patrón de hierro (cualitativo)	LV (n=26) Frecuencia n (%)	NLV (n=11) Frecuencia n (%)	p-valor (χ²)
Ferropenia	15 (57.69%)	5 (45.45%)	0.74
Bloqueo	11 (42.30%)	6 (54.54%)	
macrofágico			

En la siguiente imagen (figura 41), se esquematizan las alteraciones características en la médula ósea de los pacientes con leishmaniasis.

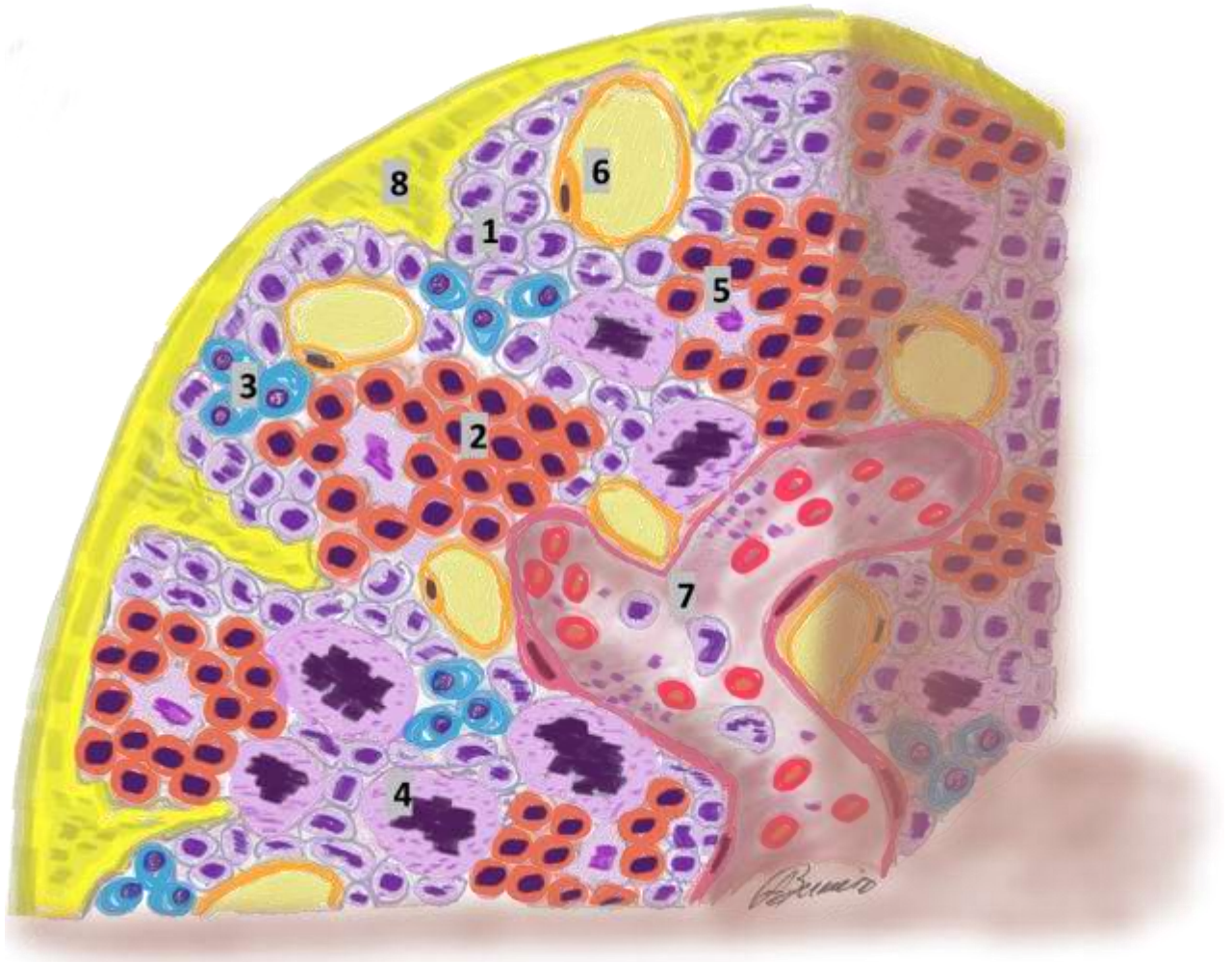


Figura 41. Imagen de una sección de médula ósea en la que se esquematizan los hallazgos citológicos característicos en los casos con leishmaniasis visceral: disminución de células mieloides o granulocíticas (1), aumento de serie eritroide (2), aumento de células plasmáticas (3) y aumento de megacariocitos (4). Otros datos habituales son aumento de macrófagos (5) y aumento global de celularidad con disminución de células grasas (6). Se observan también un vaso sanguíneo (7) y el tejido óseo (8). (imagen del autor)

6.2. Otros resultados descriptivos

Se han descrito y comparado los resultados obtenidos entre subgrupos de pacientes con leishmaniasis visceral establecidos en función de las siguientes características: observación o no de la *Leishmania* en la médula ósea, presencia o no de factores de inmunodepresión, origen geográfico y presencia o no de hemofagocitosis. Estos datos se evaluaron en el grupo completo de pacientes diagnosticados de leishmaniasis visceral en el período 2009-2014.

6.2.1. Características diferenciales entre los pacientes en los que se observó *Leishmania* en la médula ósea y los que no se observó.

En algunos de los parámetros evaluados se encontraron diferencias significativas entre aquellos pacientes en los que se observó la *Leishmania* en la médula ósea y aquellos en los que no se observó, aunque finalmente fueron diagnosticados por otros métodos (tabla 18).

Tabla 18. Parámetros que presentan diferencias significativas entre los pacientes en los que se observó *Leishmania* en la médula ósea y los que no se observó (período 2009-2014).

Distribuciones normales			
Parámetro	<i>Leishmania</i> no observada (n = 41) Media ± desviación estándar	<i>Leishmania</i> observada (n = 38) Media ± desviación estándar	p
Celularidad MO cuantitativa (0-5)	3.6 ± 0.5	3.9 ± 0.4	0.01
Leucocitos x 10 ⁹ /L	2.81 ± 0.99	2.39 ± 0.84	0.04
VSG (mm 1 ^a hora)	61.0 ± 37.4	84.9 ± 30.8	0.02
CRP (mg /L)	80.7 ± 55.7	124.8 ± 78.4	<0.01
Distribuciones no normales			
Parámetro	<i>Leishmania</i> no observada (n = 41) Mediana (P25-P75)	<i>Leishmania</i> observada (n = 38) Mediana (P25-P75)	p
% Plasmáticas MO	4.5 (3-6.5)	6.7 (4.5-9.0)	<0.01
% Linfocitos MO	6.5 (5.0-10.5)	10 (7.0-12.0)	0.02
IgG (g/L)	13.48 (10.34-18.00)	18.06 (14.70-33.31)	<0.01
IgM (g/L)	1.10 (0.64-1.59)	1.51 (1.31-2.17)	<0.01

6.2.2. Características de los pacientes inmunodeprimidos con leishmaniasis

Diversos parámetros del estudio resultaron significativamente diferentes entre los pacientes con factores de inmunodepresión, distinguiendo VIH (10 pacientes) y tratamientos inmunosupresores (8 pacientes) (tabla 19). En la serie completa del brote de Fuenlabrada, que abarca hasta el año 2018, con 111 pacientes con LV, se describieron 11 pacientes VIH y 16 con tratamientos inmunosupresores.[103]

Tabla 19. Comparación entre pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos con leishmaniasis visceral (período 2009-2014).

Distribuciones normales					
Parámetro	Inmunocompetentes (n = 57) Media ± desviación estándar	VIH (n=10) Media ± desviación estándar	p	Tratamiento inmunosupresor (n = 8) Media ± desviación estándar	p
Serie eritroide % (MO)	39,2 ± 10.1	30.7 ± 10.0	0.02	38.2 ± 14.3	NS
% Linfocitos (MO)	8.76 ± 4.51	15.25 ± 9.31	<0.01	6.31 ± 2.52	NS
IgM	1.53 ± 1.08	2.51 ± 1.28	NS	2.83 ± 3.16	<0.01
LDH	538.6 ± 274.2	288.3 ± 139.8	<0.01	432.7 ± 227.4	NS
CRP	108.8 ± 67.4	50.5 ± 48.1	<0.01	97.1 ± 85.6	NS
Distribuciones no normales					
Parámetro	Inmunocompetentes Mediana (P25-P75)	VIH Mediana (P25-P75)	p	Tratamiento inmunosupresor Mediana (P25-P75)	p
IgG	15.1 (13.3-20.9)	25.9 (17.8-39.4)	0.05	15.3 (13.4-48.6)	NS
GGT	73 (40-185)	124 (47-165)	NS	32 (23-52)	0.01
ALT	60 (32-122)	23.5 (10-33)	<0.01	26.5 (12-42)	<0.01
AST	86 (46-124)	35 (31-64)	0.01	35 (22-56)	<0.01
NS: no significativo					

Otros parámetros, como las plaquetas, se encontraban relativamente más elevadas en los pacientes VIH, mientras que la ferritina, los triglicéridos, la VSG y los linfocitos absolutos en sangre estaban más bajos, pero sin apreciarse diferencias significativas.

Algunos parámetros cualitativos medulares fueron más frecuentes en los pacientes con VIH respecto a los inmunocompetentes, como la disgranulopoyesis (40% frente a 0%, $p < 0.01$) y la dismegacariopoyesis (40% frente a 8,7%, $p < 0.01$). También fue más frecuente la diseritropoyesis (70% frente a 38.5%), pero sin alcanzar significación estadística. En los pacientes con tratamientos inmunosupresores, estos parámetros fueron similares a los inmunocompetentes. El porcentaje de casos en los que se observó el parásito en médula fue similar para los tres grupos: 46% en inmunocompetentes, 50% en pacientes VIH y 50% en pacientes con tratamientos inmunosupresores. En los pacientes con tratamiento inmunosupresor fue muy frecuente la presencia de hemofagocitosis (87%, 7 casos), pero sólo 1 de ellos cumplió criterios de linfohistiocitosis hemofagocítica.

6.2.3. Características de los pacientes africanos subsaharianos con leishmaniasis

Se detectaron parámetros del estudio que resultaron significativamente distintos entre los pacientes de origen local (grupo españoles) y los africanos de origen subsahariano (grupo africanos), que constituían la gran mayoría de extranjeros afectados (tabla 20).

Tabla 20. Parámetros que presentan diferencias significativas entre pacientes españoles y africanos con leishmaniasis visceral (período 2009-2014).

Distribuciones normales			
Parámetro	Espanoles (n = 43) Media ± desviación estándar	Africanos (n=29) Media ± desviación estándar	p
Serie mieloide % (MO)	44.9 ± 10.8	37.9 ± 9.5	<0.01
VCM (fL)	87.2 ± 5.8	77.3 ± 5.7	<0.01
Plaquetas X 10 ⁹ /L	85.2 ± 39.5	119.7 ± 38.3	<0.01
Distribuciones no normales			
Parámetro	Espanoles (n = 43) Mediana (P25-P75)	Africanos (n=29) Mediana (P25-P75)	p
% Células plasmáticas (MO)	4.5 (3-6.5)	7.0 (4.8-8.6)	<0.01
CRP (mg / L)	83 (35-113)	127 (81-193)	<0.01
BT (μmol / L)	12.3 (8.7-18.9)	8.7 (6.8-12.3)	
ALT (u / L)	35 (18-73)	77 (29-150)	0.01

Destaca también entre los datos demográficos la menor edad de los africanos (mediana de 34 años frente a 52 de los españoles, $p < 0.01$) con algo menor proporción de mujeres (13% frente a 20% en los españoles). La proporción de pacientes con infección VIH fue ligeramente menor (10% frente a 14% en los españoles).

6.2.4. Características de los pacientes con fenómenos de hemofagocitosis y leishmaniasis

Se presentaron también diferencias entre los pacientes en los que se observaron fenómenos de hemofagocitosis en médula ósea y aquellos en los que no se observaron (tabla 21).

Tabla 21. Parámetros que presentan diferencias significativas entre pacientes con y sin hemofagocitosis del grupo con leishmaniasis visceral (período 2009-2014).

Distribuciones normales			
Parámetro	No hemofagocitosis (n = 39)	Hemofagocitosis (n=40)	p
	Media ± desviación estándar	Media ± desviación estándar	
Celularidad cuantitativa en MO (0-5)	3.64 ± 0.50	3.92 ± 0.38	<0.01
Megacariocitos cuantitativos en MO (0-5)	3.59 ± 0.64	3.97 ± 0.72	0.01

Distribuciones no normales			
Parámetro	No hemofagocitosis (n = 39)	Hemofagocitosis (n=40)	p
	Mediana (P25-P75)	Mediana (P25-P75)	
ALT (u / L)	33 (21-53)	60 (29-134)	0.02
AST (u / L)	46 (32-83)	86 (46-134)	0.01
% Macrófagos (MO)	1 (0.5-1)	1.5 (1-3)	<0.01

Entre los pacientes con hemofagocitosis, los 9 pacientes que cumplían criterios de linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) presentaron una frecuencia más alta de hemofagocitosis intensa (22 % frente a 4 %) y de hemofagocitosis de linfocitos y plaquetas (33 % frente a 20 %) respecto a los pacientes con LV que no los cumplían, pero sin alcanzar el nivel de significación. Estos pacientes con HLH no presentaron diferencias significativas respecto al resto de pacientes con hemofagocitosis en ninguno de los parámetros de médula o sangre, salvo en el recuento aumentado de plaquetas o los triglicéridos, parámetros que entran en los criterios de la propia HLH.

La frecuencia de fenómenos de hemofagocitosis fue similar entre los pacientes de origen africano subsahariano y los españoles (52 % y 49 %, respectivamente), con mayor proporción de pacientes africanos con criterios de HLH (14% frente a 7%), aunque sin llegar a la significación estadística.

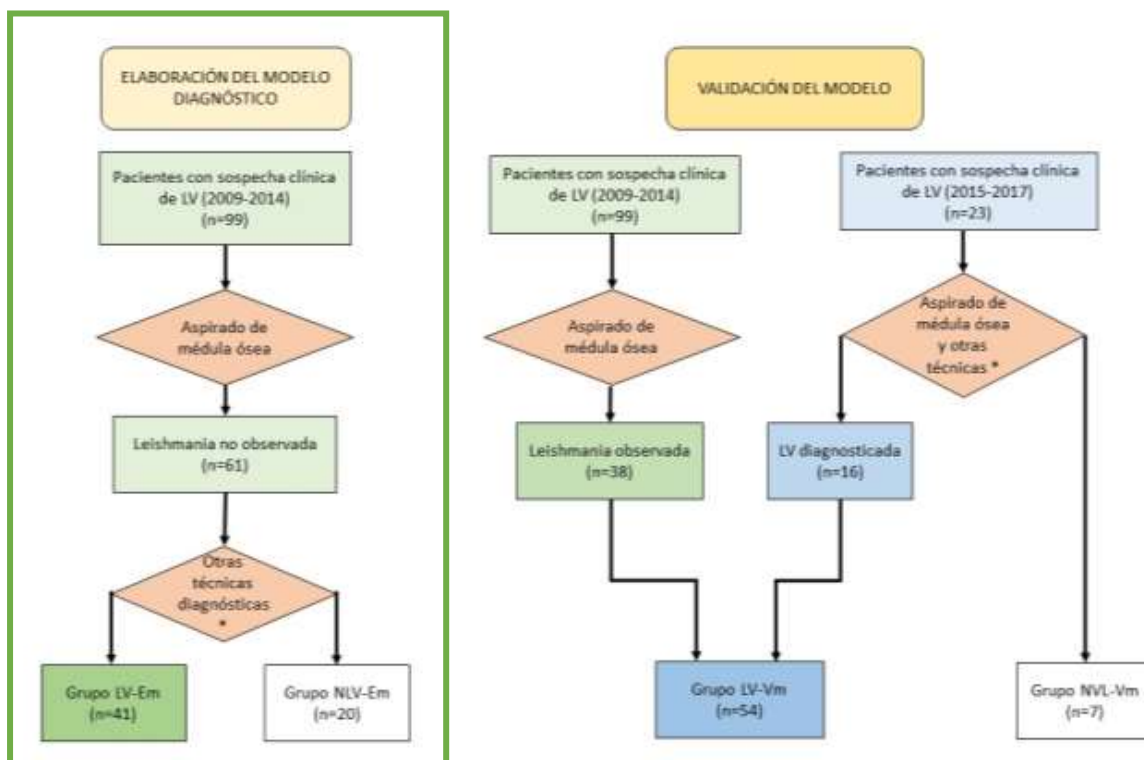
Respecto a una posible asociación con inmunodepresión, ya se ha señalado que la frecuencia de fenómenos de hemofagocitosis fue similar en los inmunodeprimidos. La mayor parte de los pacientes con criterios de HLH estaban en el grupo de inmunocompetentes (7 pacientes) y sólo 1 paciente estaba con tratamiento inmunosupresor. El paciente restante padecía una neoplasia.

La proporción de leishmaniasis en las que no se observó el parásito en el estudio medular fue similar tanto en el grupo total de leishmaniasis (48%) como en el grupo que presentaba hemofagocitosis (51%) como en el grupo de HLH (44%).

6.3. Desarrollo de un modelo predictivo diagnóstico basado en las alteraciones detectadas en médula ósea

Se ha desarrollado un modelo predictivo diagnóstico, basado en los datos diferenciales recogidos en el aspirado de médula ósea, con el objetivo de aproximar el diagnóstico de leishmaniasis visceral en los casos en que las pruebas diagnósticas realizadas inicialmente (observación del parásito en el aspirado de médula ósea o RDT) fueran negativas.

La muestra con la que se desarrolló el **modelo predictivo** la constituyeron 61 pacientes: 41 pacientes del grupo leishmaniasis visceral (en los que no se había observado la *Leishmania* al microscopio) y 20 pacientes del grupo no leishmaniasis visceral, todos recogidos en el período 2009-2014 (esquema 2).



Esquema 2. Grupos de pacientes reclutados por el estudio, sin incluir a los pacientes diagnosticados de SMD. *Otras técnicas diagnósticas: PCR, ELISA y/o cultivos. Em: elaboración del modelo, Vm: validación del modelo.

6.3.1. Análisis univariante

Partiendo de los datos observados en médula ósea en pacientes en los que no se observó *Leishmania*, se realizó primero un análisis univariante (tablas 22 y 23) que comparaba los pacientes finalmente diagnosticados de leishmaniasis visceral (grupo LV) con aquellos en los que no se pudo establecer dicho diagnóstico (grupo NLV).

Tabla 22. Elaboración del modelo. Análisis univariante de los parámetros cuantitativos de médula ósea.

Parámetro en médula ósea	LV (n=41) * Media ± Desviación estándar	NLV (n=20) * Media ± Desviación estándar	LV (n=41) * Mediana (P25-P75)	NLV (n=20) * Mediana (P25-P75)	p-valor (test Mann- Whitney)	Area bajo curva COR
Celularidad cuantitativa (0-5/5)	3.6±0.4	3.5±0.5	4.0 (3.5-4.0)	3.5 (3.0-4.0)	0.22	0.59
Serie mieloide %	43.2±10.3	56.0±10.1	44.0 (35.5-49.0)	56.0 (46.7-61.0)	0.00	0.79
Serie eritroide %	38.8±11.8	29.3±11.9	38.0 (31.5-44.5)	26.7 (21.5-36.5)	0.01	0.70
Ratio mielo-eritroide	1.3±0.7	2.5±2.0	1.2 (0.7-1.5)	2.1 (1.4-2.9)	< 0.01	0.74
Células plasmáticas %	4.7±2.8	2.3±1.8	4.5 (3.0-6.5)	1.5 (1.0-3.7)	< 0.01	0.77
Macrófagos %	1.6±1.6	0.7±0.8	1.0 (0.5-2.5)	0.5 (0.5-0.7)	0.02	0.66
Linfocitos %	8.3±4.8	7.1±3.6	6.5 (5.0-10.5)	6.7 (4.2-9.2)	0.57	0.54
Eosinófilos %	4.9±7.9	6.5±6.0	3.0 (2.0-5.0)	4.8 (3.0-7.0)	0.06	0.34
Megacariocitos cuantitativos (0-5/5)	3.9±0.6 (n=40)	3.4±0.7 (n=17)	4.0 (4.0-4.0) (n=40)	3.0 (3.0-4.0) (n=17)	< 0.01	0.69

Tabla 23. Elaboración del modelo. Análisis univariante de los parámetros cualitativos de médula ósea.

Parámetro en médula ósea	LV (n=41) Frecuencia (%)	NLV (n=20) Frecuencia (%)	p-valor (test χ^2)	Area bajo curva COR
Hemofagocitosis	48.7	45.0	0.78	0.51
Hemofagocitosis de eritrocitos	39.0	40.0	0.94	0.50
Hemofagocitosis de leucocitos y plaquetas	29.2	5.0	0.03	0.62
Disgranulopoyesis	4.8	0.0	0.31	0.50
Diseritropoyesis	41.6	25.0	0.29	0.59
Disnegacariopoyesis	14.6	0.0	0.07	0.50
Megaloblastosis	9.7	5.0	0.52	0.52

* n indicado entre () si n es diferente del número total de pacientes.

Los parámetros asociados significativamente (valor $p < 0,05$) con el diagnóstico de *Leishmania* en el análisis univariante fueron serie mieloide %, serie eritroide %, relación mielo-eritroide, células plasmáticas %, macrófagos %, megacariocitos cuantitativos y hemofagocitosis de leucocitos y plaquetas. Estos 7 parámetros se seleccionaron para el análisis multivariante.

6.3.2. Análisis multivariante

Tras haber obtenido la tabla o matriz de correlaciones de las variables significativas independientes se detectó que 3 de las 7 variables (serie mieloide %, serie eritroide % y la relación mielo-eritroide) estaban fuertemente correlacionadas, por lo que no era conveniente incluir las tres y se seleccionó la que tenía el mayor poder discriminante, serie mieloide %. De las 5 variables restantes, debían seleccionarse un máximo de 4, dado el tamaño muestral disponible (grupo NLV con $n=20$). Las 4 variables seleccionadas con criterio de potencia estadística para el modelo de regresión logística multivariable fueron: serie mieloide %, células plasmáticas %, macrófagos % y megacariocitos cuantitativos. Siguiendo la estrategia de modelización hacia atrás, se sacó del modelo la variable macrófagos %, de forma que el

modelo final incluyó sólo 3 variables: serie mieloide %, células plasmáticas % y megacariocitos cuantitativos. La fórmula de probabilidad obtenida para este modelo fue:

$$P_{(Leishmania)} = \frac{1}{1 + e^{-(1.14 - 0.12 * MS + 0.40 * PLA + 1.17 * MEG)}}$$

Ecuación 1. Probabilidad de *Leishmania* en función de los parámetros en médula ósea: MS: serie mieloide %, PLA: células plasmáticas %, MEG: megacariocitos cuantitativos.

El área bajo la curva COR de este modelo fue de 0,87 (0.78-0.96) (figura 42).

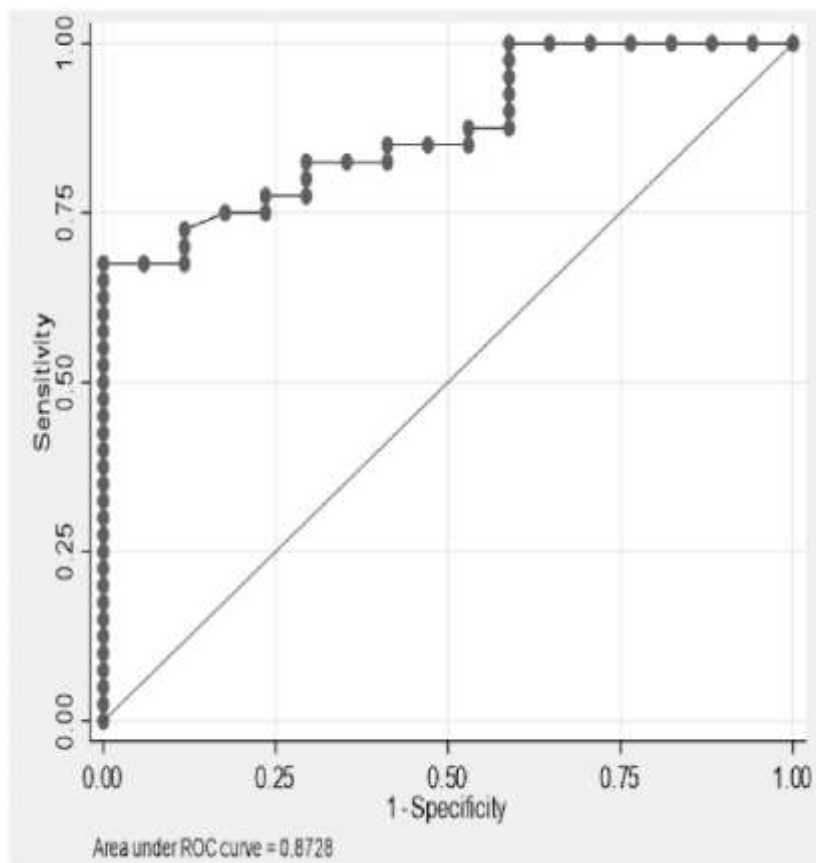


Figura 42. Curva COR del modelo predictivo de leishmaniasis visceral.

La evaluación de la calibración del modelo por la prueba de Hosmer-Lemeshow mostró una p de 0,145 ($> 0,05$) que indica ausencia de diferencias significativas entre las probabilidades observadas en cada grupo de riesgo y las pronosticadas por el modelo (figura 43).

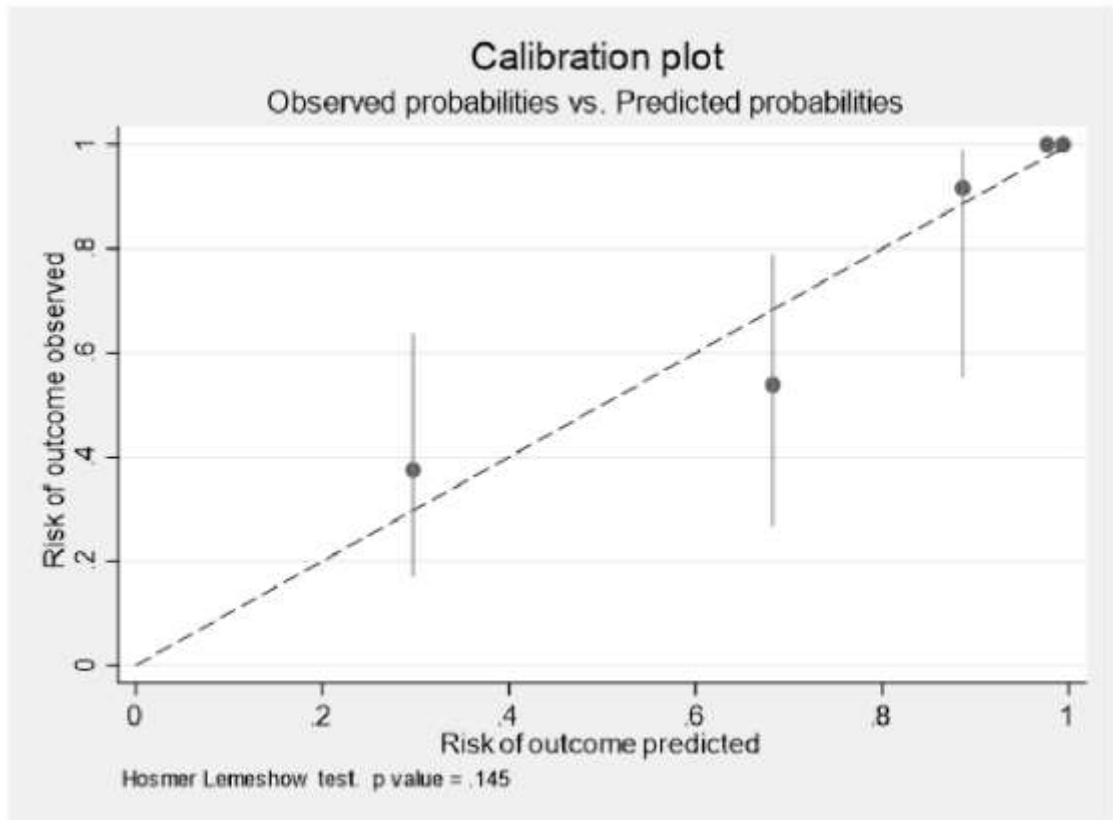


Figura 43. Calibración del modelo por la prueba de Hosmer-Lemeshow.

6.3.3. Elaboración de un nomograma

Se desarrolló un nomograma a partir del modelo, para predecir la probabilidad de que un paciente tenga leishmaniasis visceral (Figura 44).

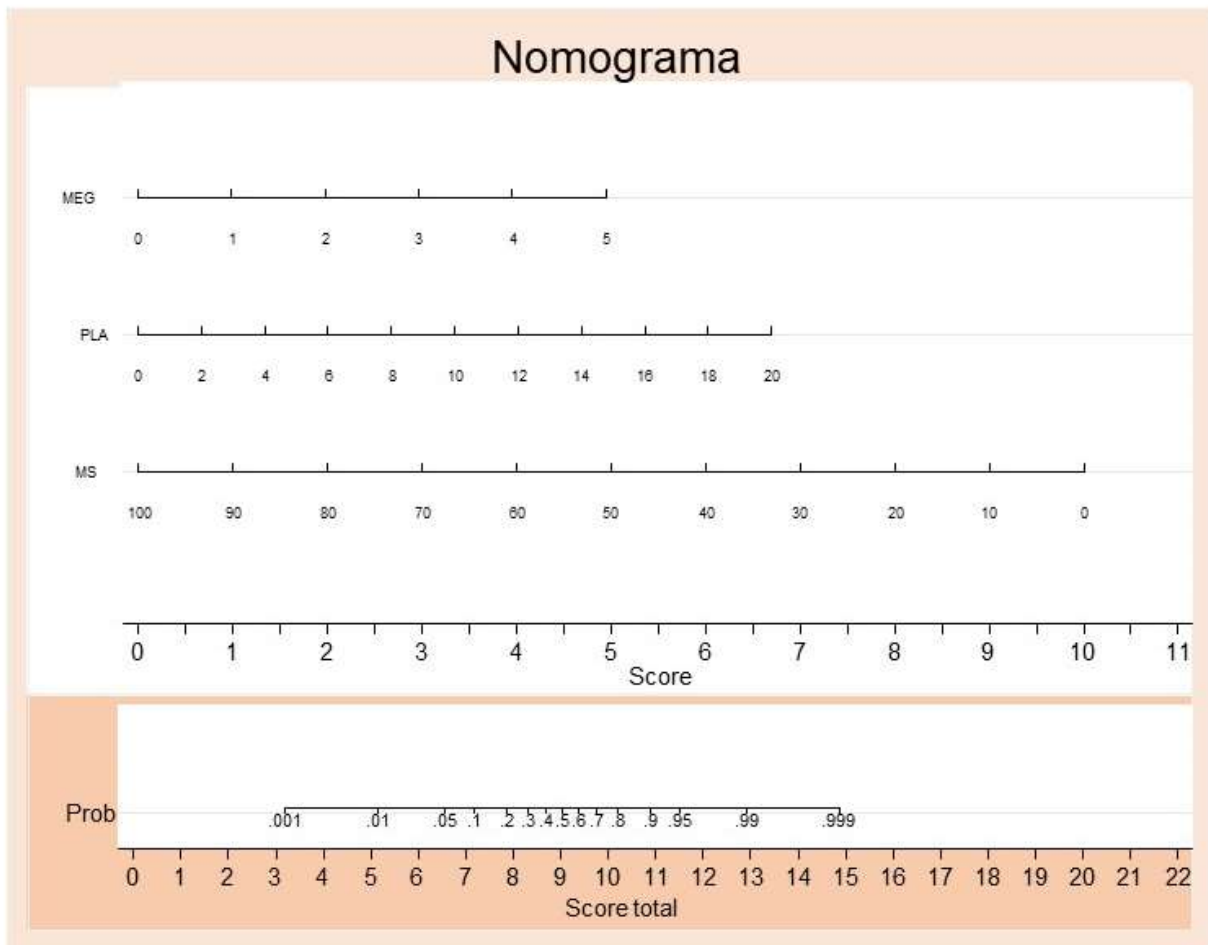


Figura 44. Nomograma del modelo de predicción leishmaniasis visceral. Desde el valor de cada parámetro (MEG, PLA o MS), se traza la vertical hacia la línea "score" y se anota el valor de cada parámetro en esa línea. Se suman los 3 valores y se lleva el resultado a la línea "Score total". Se traza la vertical de esa suma sobre la línea "Prob" y el resultado es la probabilidad de leishmaniasis visceral (0-1).

6.3.4. Creación de un sistema de puntuación predictivo

Finalmente, a partir del mismo modelo se construyó un **sistema de puntuación predictivo o "score"** para la leishmaniasis visceral. Para ello se categorizaron las variables incluidas en el modelo final, teniendo en cuenta los valores de normalidad y el número de casos a la hora de establecer las categorías. Se establecieron 3 categorías en el parámetro células plasmáticas (< 2 %, 2-5 % y > 5 %), y 2 categorías en serie mieloide (< 50 % y ≥ 50%) y megacariocitos

(cuantificación ≤ 3 y > 3), estableciendo la puntuación a partir de coeficientes obtenidos de los “odds ratio” de cada categoría. Los puntos asignados a cada categoría son:

1. Serie mieloide $< 50\%$: 1 punto
2. Células plasmáticas 2-5%: 1 punto. Células plasmáticas $> 5\%$: 2 puntos.
3. Megacariocitos cuantitativos > 3 : 1 punto.

El rango de puntuación (suma de los puntos de cada parámetro) va de 0 a 4 puntos, correspondiendo para cada puntuación una probabilidad de tener leishmaniasis visceral y de no tenerla (tabla 24).

Tabla 24. Score de leishmaniasis visceral.

Parámetro del score	Puntos asignados por categoría		
	Serie mieloide %	≥ 50	< 50
	0 puntos	1 punto	
Células plasmáticas %	< 2	2-5	> 5
	0 puntos	1 punto	2 puntos
	Megacariocitos cuantitativos (0-5)	≤ 3	> 3
	0 puntos	1 punto	
Puntuación			
Puntuación (suma de puntos)	Probabilidad de LV	Probabilidad de NLV	
0	0%	100%	
1	50%	50%	
2	60%	40%	
3	88%	12%	
4	100%	0%	

En la siguiente tabla se detalla la distribución del score en valores absolutos en función del diagnóstico de *Leishmania* (tabla 25), mientras que la figura de abajo muestra el mismo sistema de puntuación en un gráfico (figura 45).

Tabla 25. Distribución del score en valores absolutos en función del diagnóstico de Leishmania.

Score	No Leishmaniasis	Leishmaniasis	Total
0	5 (100%)	0 (0%)	5 (100%)
1	4 (50%)	4 (50%)	8 (100%)
2	6 (40%)	9 (60%)	15 (100%)
3	2 (11.11%)	16 (88.89%)	18 (100%)
4	0 (0%)	11 (100%)	11 (100%)
Total	17 (100%)	40 (0%)	57 (100%)

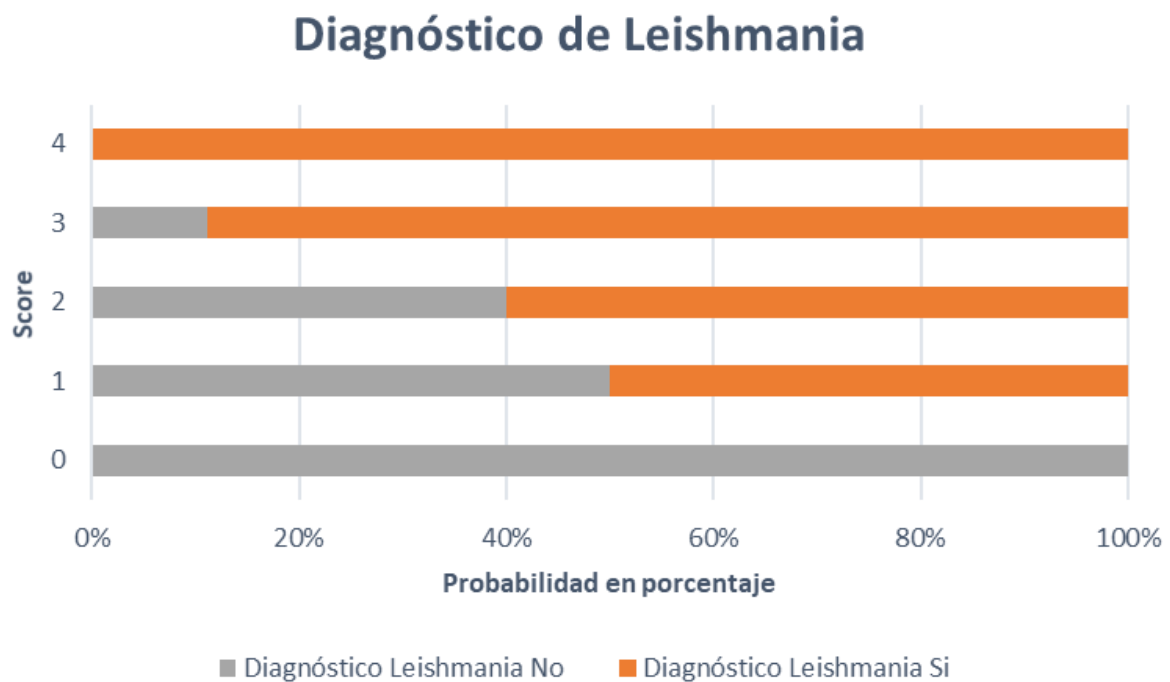


Figura 45. Gráfico del “score” predictivo de leishmaniasis visceral.

El área bajo la curva COR de este sistema de puntuación fue de 0,85 y la prueba Hosmer-Lemeshow indicó ausencia de diferencias significativas entre las probabilidades observadas y pronosticadas (p -valor 0,57) (figuras 46 y 47).

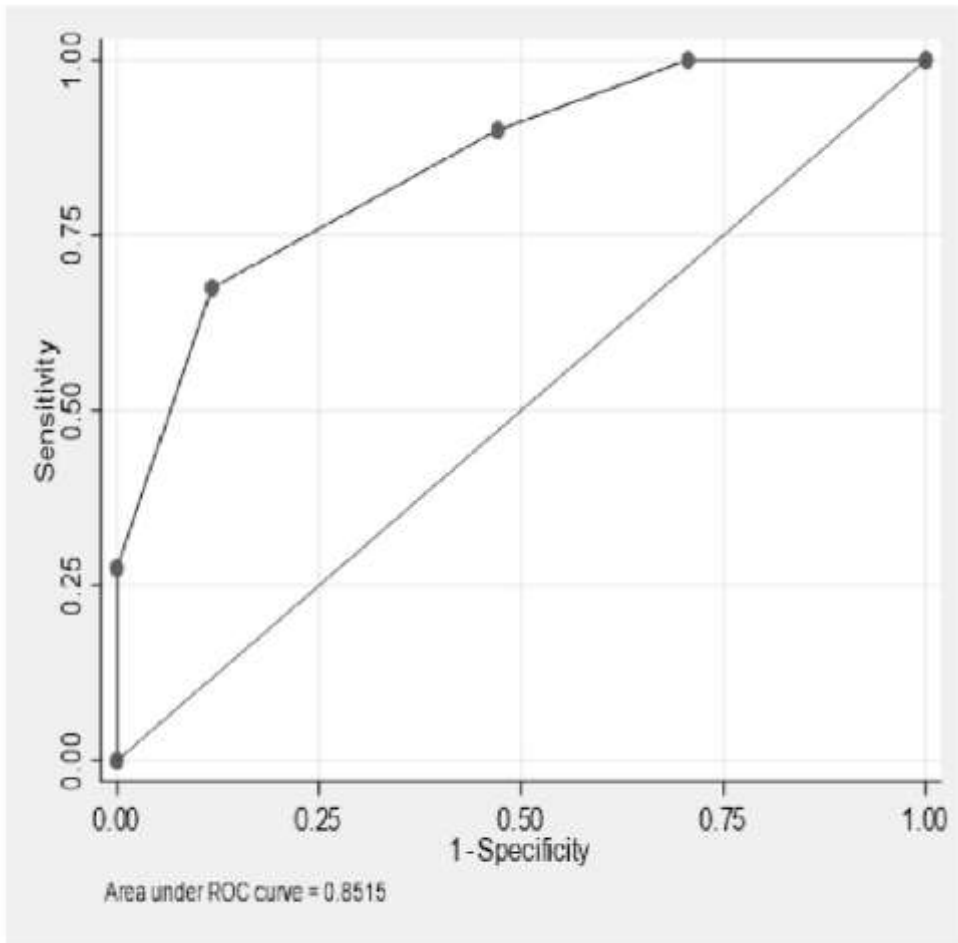


Figura 46. Curva COR del score predictivo de leishmaniasis visceral.

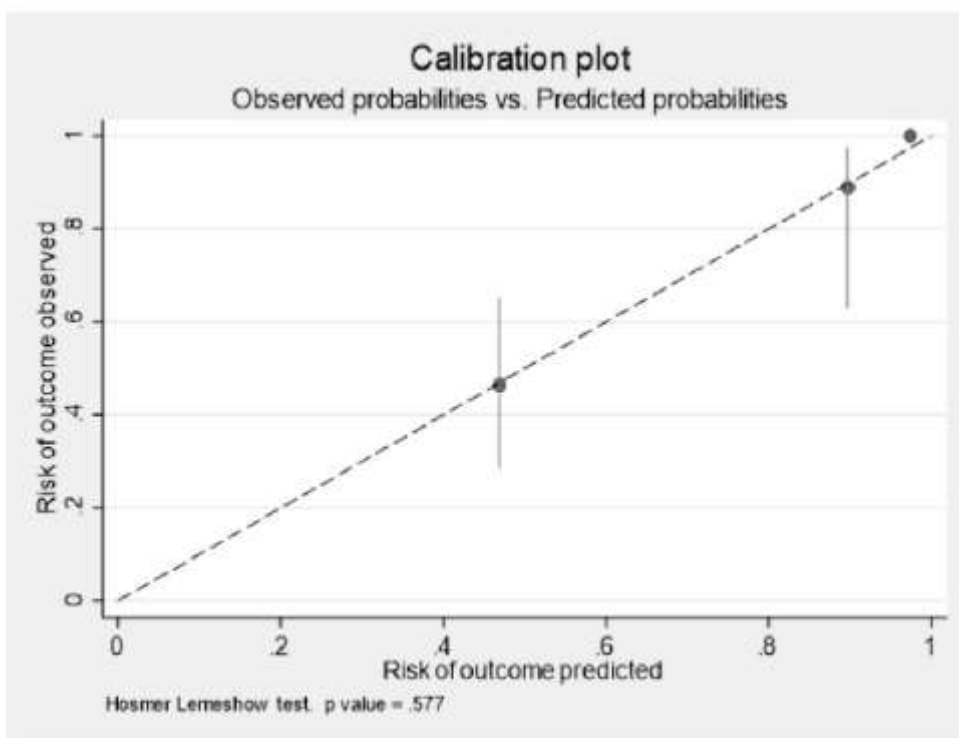


Figura 47. Calibración del score por la prueba de Hosmer-Lemeshow.

Se indican como ejemplos algunos de los pacientes del estudio en los que no se veía el parásito en la médula ósea, en los que podemos calcular la probabilidad de tener LV mediante el nomograma y el “score” predictivo.

Caso 1. Mujer de 81 años y nacionalidad española, sin factores de inmunosupresión conocidos, que acude por fiebre de 38°C, náuseas sin vómitos y diarrea de 1 semana de evolución, más pérdida de peso de 3 kg en los últimos 2 meses. No presenta esplenomegalia ni otras alteraciones a la exploración. En el hemograma destacan leucopenia (3.2×10^9 plaquetas/L), anemia (Hb 108 g/L) y trombocitopenia (68×10^9 plaquetas/L). Se indica la realización de un aspirado de médula ósea, con un 60% de serie mieloide, 1.5% de células plasmáticas y 2/5 de megacariocitos cuantitativos; el cálculo con el nomograma de la probabilidad de tener leishmaniasis visceral es de 0.05 (5%) (figura 48).

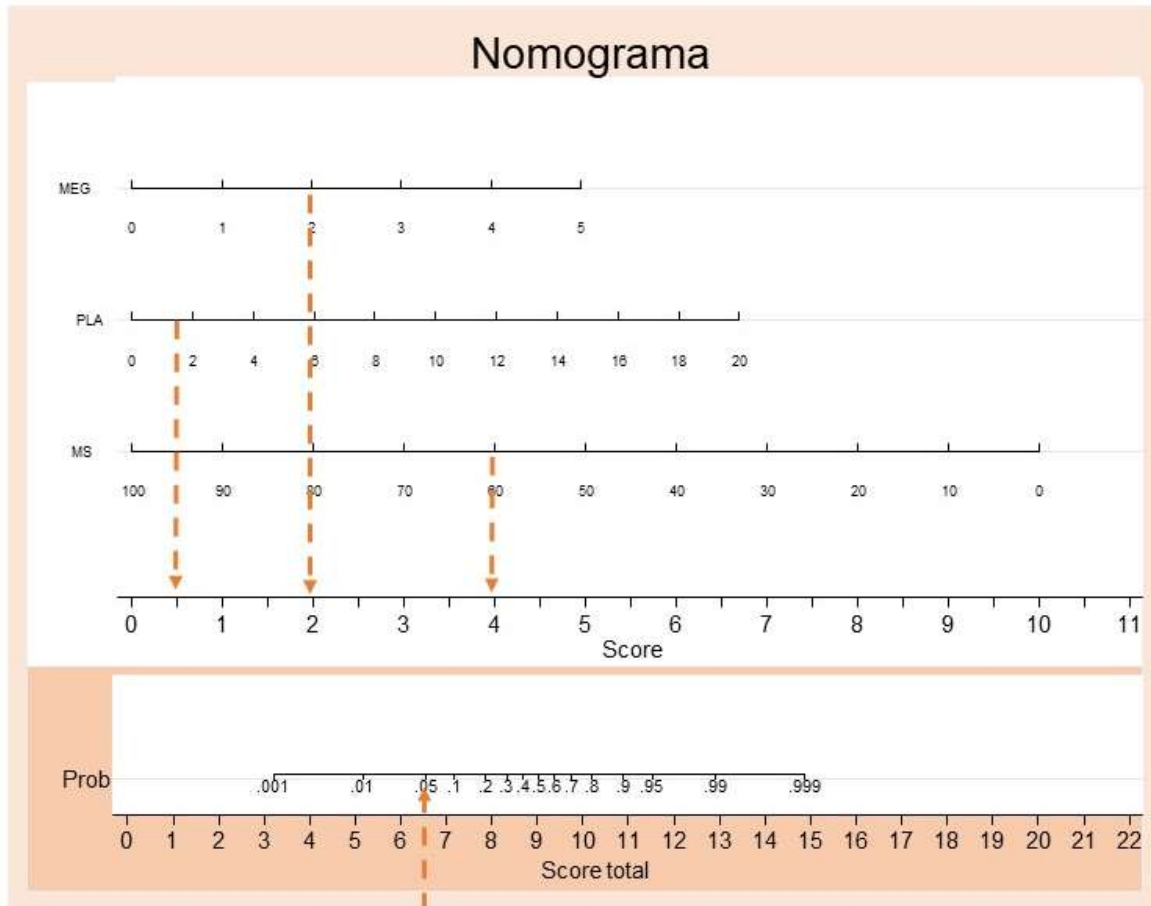


Figura 48. Nomograma del caso 1 (flechas segmentadas).

Aplicando el “score” a este paciente con serie mieloide 60%, células plasmáticas 1,5% y megacariocitos cuantitativos 2 el resultado sería de 0, lo que corresponde a 0% de probabilidad de tener LV.

En el estudio medular se descartaron causas neoplásicas de pancitopenia, incluido el SMD, y se observó un patrón de hierro de bloqueo inflamatorio macrofágico. Los resultados del ELISA y la PCR de Leishmania fueron negativos y el diagnóstico final del paciente fue infección por *Salmonella sp* detectada en coprocultivo.

Caso 2. Varón de 54 años y nacionalidad española, bajo tratamiento con etanercept, deflazacort y metrotexate por una artritis reumatoide, que presenta fiebre de 3 de días de

evolución hasta 40°C, y en la radiografía de tórax una opacidad alveolar en LID, por lo que inicia tratamiento antibiótico empírico para neumonía. Presenta también anemia (Hb101 g/L) y trombocitopenia (108×10^9 plaquetas/L) en el hemograma. A pesar de la mejoría del cuadro respiratorio, una semana después persisten la fiebre y las citopenias, detectándose además esplenomegalia de 15 cm en la ecografía abdominal, por lo que se indica la realización de un aspirado de médula ósea, que presenta 40% de serie mieloide, 7% de células plasmáticas, 4/5 de megacariocitos cuantitativos y fenómenos de hemofagocitosis; la probabilidad calculada de LV es del 0.98 (98%) (figura 49).

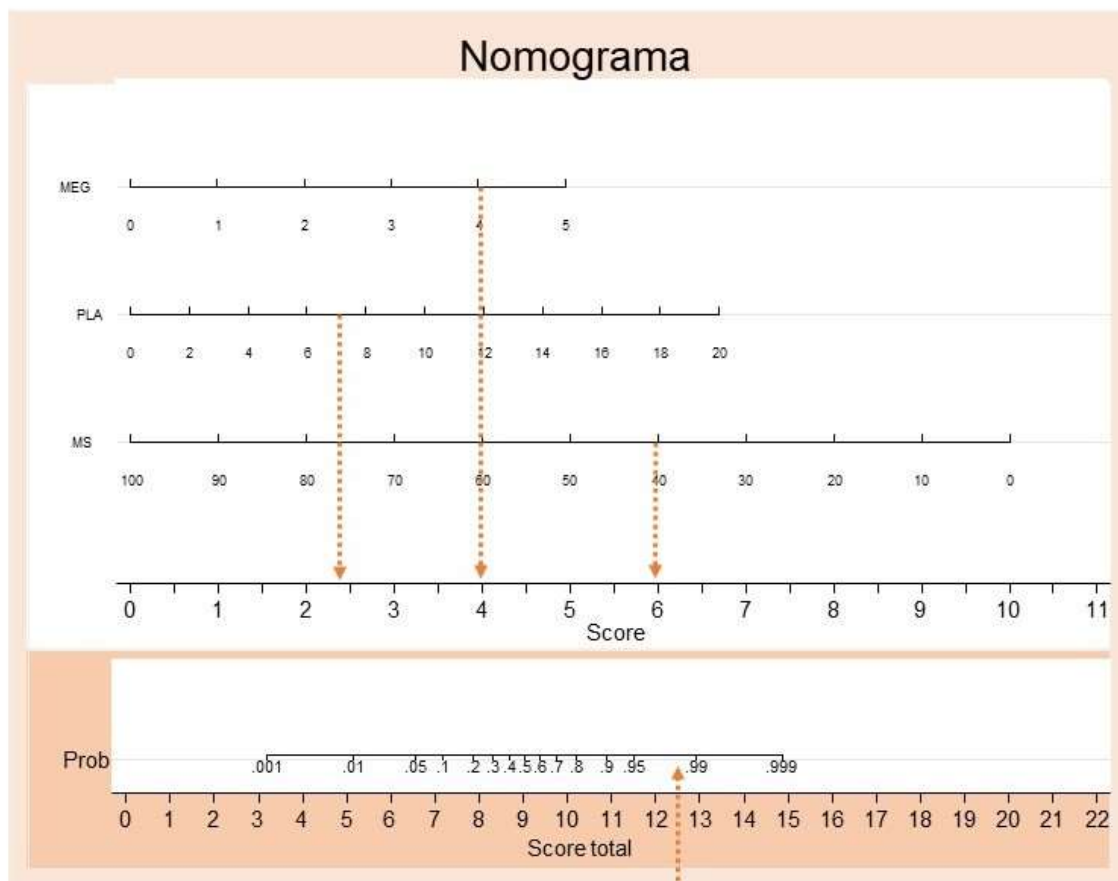


Figura 49. Nomograma del caso 2 (flechas de puntos).

En este caso, el “score” del paciente es de 4, que corresponde al 100% de probabilidad. La PCR y ELISA confirmaron el resultado de LV.

Caso 3. Mujer africana de 21 años, que no ha viajado a su país de origen desde hace 10 años, y VIH positivo, sin tratamiento antirretroviral durante los 2 últimos años. Acude por fiebre de hasta 39°C, escalofríos, odinofagia y vómitos, de 6 días de evolución. A la exploración presenta adenopatías submandibulares bilaterales de 1 cm e hiperemia faríngea; en el hemograma se objetiva bicitopenia (Hb 95 g/L, 147×10^9 plaquetas/L, 2.5×10^9 leucocitos/L y 1.7×10^9 neutrófilos/L) y presenta esplenomegalia de 14 cm por ecografía. El TDR-rK39 de *Leishmania* fue positivo en este caso, realizándose también aspirado de médula ósea, con 55% de serie mieloide, 8% de células plasmáticas y 3/5 de megacariocitos cuantitativos; tenía una probabilidad calculada de LV de 0.78 (78%) (figura 50).

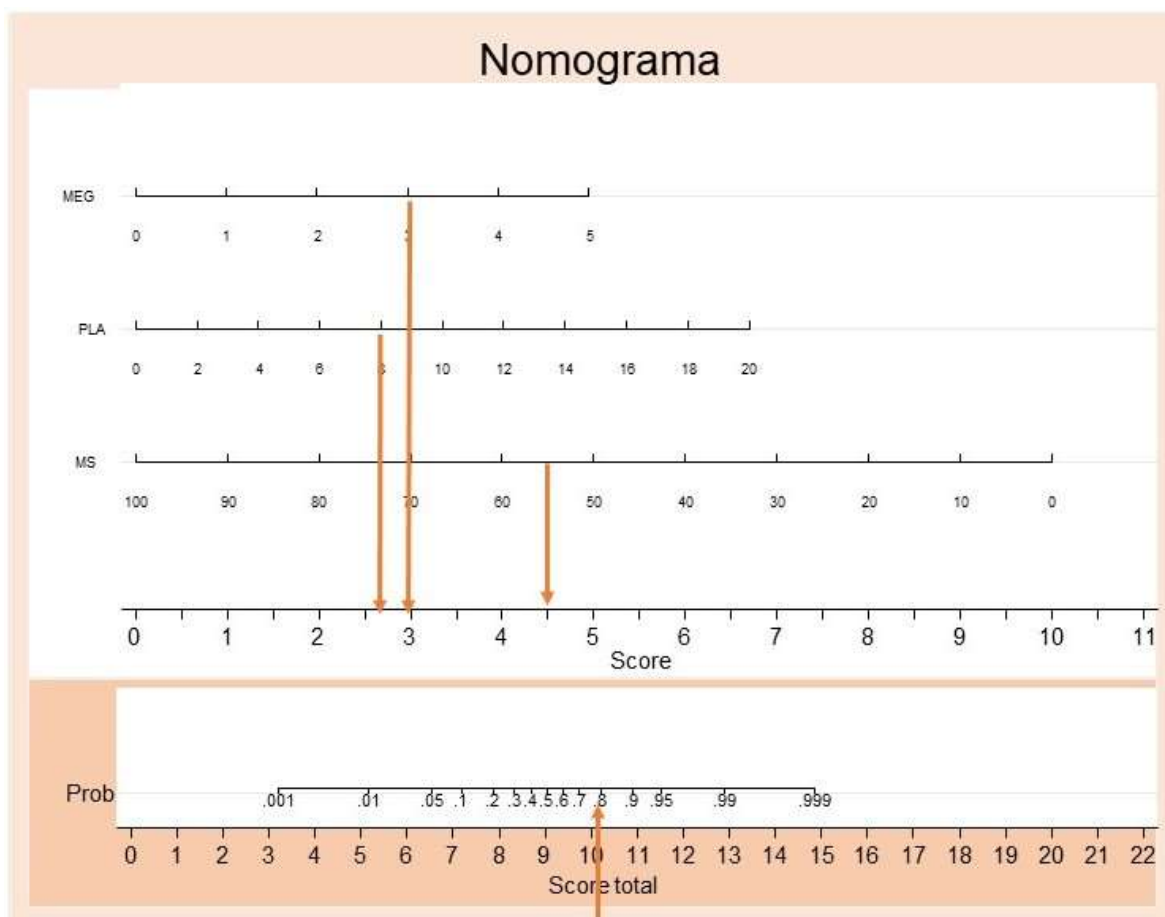


Figura 50. Nomograma del caso 3 (flechas continuas).

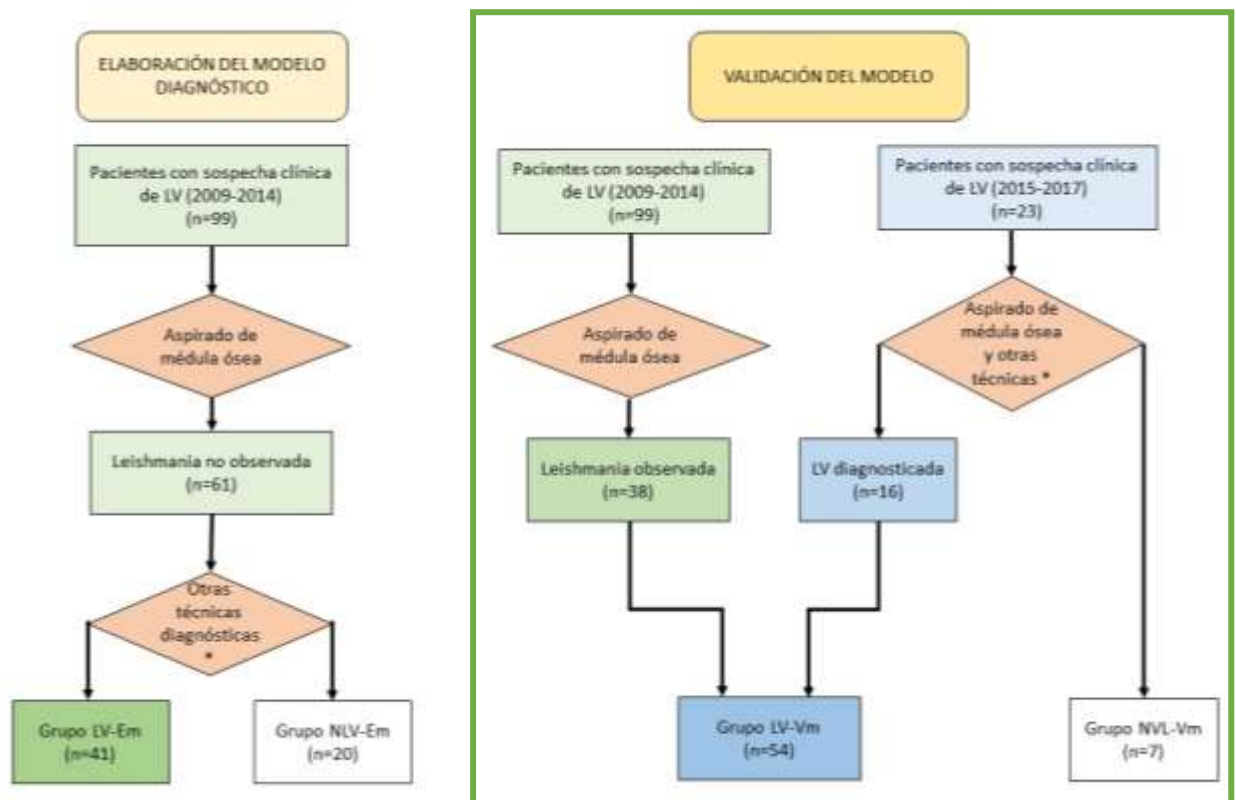
En este tercer ejemplo, el “score” sería de 2, que corresponde a un 60% de probabilidad de leishmaniasis. El resultado de PCR en médula ósea fue también positivo en este caso.

6.3.5. Validación interna del modelo predictivo por “bootstrap”

La puntuación del modelo fue validada internamente por técnicas de “bootstrap”, generando 200 muestras “bootstrap” con reemplazamiento desde los datos originales. El área bajo curva ROC ajustada para el sobreoptimismo fue de 0.850 (0.752-0.949), muy similar al área aparente bajo curva del modelo (0.851). La calibración de esta técnica fue validada por la evaluación de la pendiente de calibración (0.99) y por el cálculo de la prueba de Hosmer-Lemeshow en cada muestra de “bootstrap” (ninguna con diferencias significativas).

6.4. Validación externa del modelo

Para la muestra de **validación externa** del modelo, se recopilaron datos de 61 pacientes: 54 pacientes del grupo leishmaniasis visceral (los 38 en los que se había observado la *Leishmania* en el período 2009-2014, más los 16 diagnosticados por cualquier método del período 2015-2017) y 7 pacientes del grupo no leishmaniasis visceral del período 2015-2017 (esquema 3).



Esquema 3. Grupos de pacientes reclutados por el estudio, sin incluir a los pacientes diagnosticados de SMD. *Otras técnicas diagnósticas: PCR, ELISA y/o cultivos. Em: elaboración del modelo, Vm: validación del modelo.

Una vez establecido el grupo de validación se realizaron las estadísticas descriptivas (tabla 26).

Tabla 26. Análisis descriptivo de los parámetros cuantitativos de médula ósea. Grupo de validación.

Parámetro en médula ósea	LV (n=54) * Media±Desviación estándar	NLV (n=7) * Media±Desviación estándar	LV (n=54) * Mediana (P25-P75)	NLV (n=7) * Mediana (P25-P75)
Celularidad cuantitativa (0-5/5)	3.8±0.3	3.6±0.8	4.0 (3.5-4.0)	4.0 (3.5-4.0)
Serie mieloide %	39.9±12.0	60.6±10.9	40.5 (31.0-48.5)	64.5 (52.0-69.1)
Serie eritroide %	36.5±10.9	23.6±9.8	35.75(30.0-4)	21.5 (16.2-32.6)
Ratio mielo-eritroide	1.3±1.0	3.3±2.2	1.0 (0.8-1.4)	3.0 (1.5-4.1)
Células plasmáticas %	7.9±4.3	4.3±2.1	7.5 (5.0-9.5)	4.5 (2.3-5.8)
Macrófagos %	1.9±2.8	0.2±0.2	1.0 (0.5-2.5)	0.0 (0.0-0.5)
Linfocitos %	10.8±6.4	8.7±3.5	8.5 (7.0-12.0)	8.5 (6.1-14.1)
Eosinófilos %	3.4±3.2	2.2±1.0	2.5 (1.5-4.5)	2 (1.6-3.2)
Megacariocitos cuantitativos (0-5/5)	3.8±0.7	3.4±0.9	4.0 (3.0-4.0)	3.0 (3.0-4.0)

6.4.1. Resultados de la validación externa

Al aplicar el modelo predictivo diagnóstico de leishmaniasis visceral en estos pacientes, se comprobó su buen rendimiento, con un área bajo la curva COR de 0.920 (0.818–1.000); aplicando el score predictivo, se obtuvo igualmente una buena área bajo la curva COR, de 0.902 (0.799-0.963). En este grupo también se realizaron réplicas por técnicas de “bootstrap” (2000 en esta ocasión) que en conjunto renderizaron una curva suave con un área bajo la curva COR de 0.880 (0.571–0.936) (figuras 51 y 52).

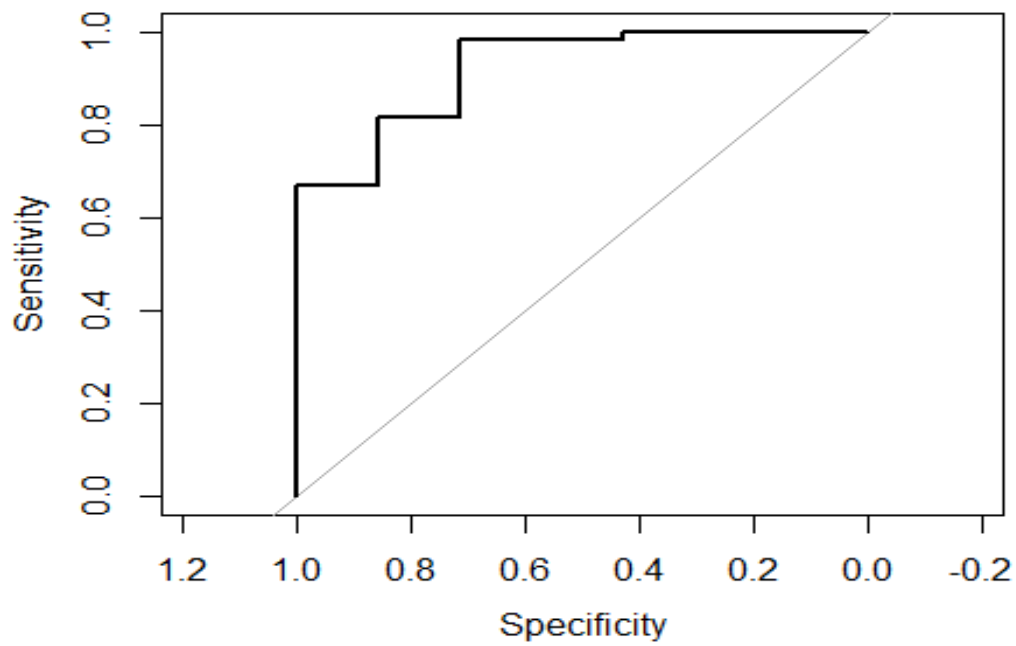


Figura 51. Curva COR aplicando el modelo predictivo al grupo de pacientes de validación.

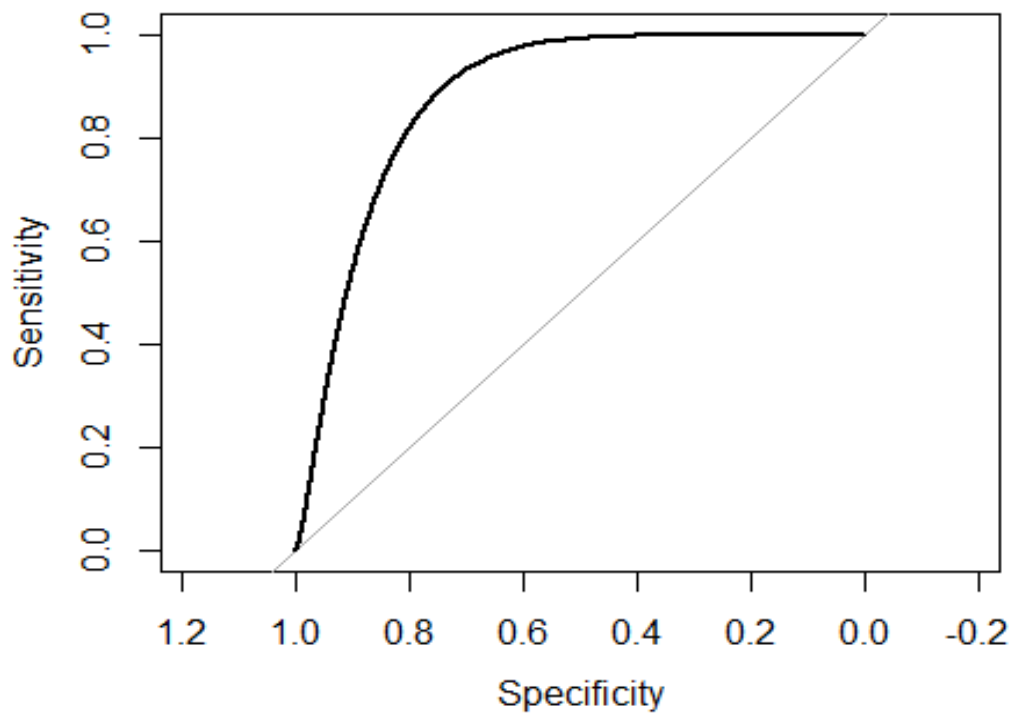


Figura 52. Curva COR "suavizada" al aplicar el modelo predictivo a los replicados "bootstrap" del grupo de pacientes de validación.

7. DISCUSIÓN

La detección de los resultados diferenciales en médula ósea de los pacientes con leishmaniasis visceral ha permitido el desarrollo de un modelo predictivo diagnóstico y de un sistema de puntuación diagnóstica que puede orientar el diagnóstico de leishmaniasis visceral en los casos sin evidencia directa de la presencia de *Leishmania*. Este modelo ha sido validado externamente, confirmando su aplicabilidad práctica. El modelo, junto con el resto de alteraciones encontradas en la médula ósea, el hemograma y la bioquímica sérica de los pacientes con leishmaniasis visceral, van a ser valorados y discutidos en detalle a lo largo de los siguientes epígrafes.

7.1. Valoración de las alteraciones bioquímicas

Los pacientes con leishmaniasis visceral confirmada en nuestro estudio presentan a nivel bioquímico aumentos de IgG e IgM, aumento de ferritina, aumento de la LDH, aumento de la CRP, aumento de la AST y aumento de los triglicéridos. Estos parámetros son en general coincidentes con las descripciones realizadas previamente por otros autores sobre pacientes con leishmaniasis visceral (tabla 27).

Tabla 27. Frecuencias y valores medios de alteraciones bioquímicas comparando con otros estudios.

Autor y país	Parámetros*									
	IgG ↑	CR ↑	FA ↑	BT ↑	ALT ↑	AST ↑	LDH ↑	TG ↑	FER ↑	CRP ↑
Sarkari IRÁN [63]		2%	44%	24%	54%	85%	72%	94%		8%
Gupta INDIA [65]				58%	66%	75%				
Lal INDIA [91]								53% 1.9 mmol/L		
Petrela ALBANIA [66]	100%									
Cascio ITALIA [68]	23 g/L				33 U/L	53 U/L				23 mg/L
Minodier FRANCIA [70]	64%									72 mg/L
Al-Jurayyan ARABIA [71]						69%			80%	
Bermejo ESPAÑA	49%	8%	25%	16%	48%	63%	78%	94%	95%	99%

*Se indica la frecuencia de casos aumentados (↑) y/o los valores medios expresados en las unidades del parámetro.

Estos estudios descriptivos muestran hipergammaglobulinemia IgG [66,70]. La **hipergammaglobulinemia**, uno de los parámetros que se consideran característicos de la

leishmaniasis visceral, fue menos frecuente en nuestros pacientes. El aumento de las células plasmáticas de la médula ósea y los aumentos de **IgG** y de **IgM** policlonales reflejan cambios inmunológicos en la respuesta a la Infección por *Leishmania*. Se ha descrito cómo en el caso de *Leishmania donovani* los amastigotes activan las células B mediante la activación de TLRs endosómicos en las células B. Esta activación resulta en la inducción de Interleucina-10 e Interferones de tipo I, lo que lleva al desarrollo de hipergammaglobulinemia [104] a través de la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

El aumento de **transaminasas** séricas [63,65,71] y la elevación de **LDH** [63] también se ha descrito. La **hiperferritinemia** sólo ha sido previamente descrita en una serie [71], quizá por ser un parámetro que no se realiza rutinariamente en estos pacientes. La elevación de transaminasas puede vincularse al daño hepático producido por la leishmaniasis visceral, al estar este órgano afectado con frecuencia. La hemólisis o destrucción de los glóbulos rojos y de los eritroblastos, vinculadas a la hemofagocitosis,[105] podría explicar la elevación de LDH (destrucción celular) y de ferritina (liberación y acúmulo del hierro de estas células), junto con la actividad inflamatoria. Reflejo de esta última es también el aumento de **CRP**.

Dos estudios reportan aumento de triglicéridos.[63][91] Para estos autores, la **hipertrigliceridemia** podría aportar un beneficio diagnóstico adicional para evaluar la probabilidad y severidad de la leishmaniasis visceral, junto a los otros parámetros de diagnóstico disponibles. Esta alteración estaría relacionada con niveles elevados de VLDL, pero no se conoce bien el mecanismo, especulándose como posibilidad el secuestro y degradación de las lipoproteínas en el bazo o hígado aumentados de tamaño.[91]

7.2. Valoración de las alteraciones hematimétricas

Las alteraciones diferenciales que presentan en el **hemograma** nuestros pacientes (anemia, leucopenia y trombocitopenia) ya han sido ampliamente descritas por numerosos autores [25,63–68,71,74,87–90], sobre todo la anemia, con valores de hemoglobina media tan bajos como 69 o 71 g/L.[66,70,71,88]. También son frecuentes en la mayoría de los estudios descriptivos la trombocitopenia, la leucopenia, la neutropenia y la pancitopenia (tabla 28). Varios estudios refieren igualmente una alta frecuencia de **velocidad de sedimentación globular** elevada, otro reactante inflamatorio.

Tabla 28. Frecuencias y valores medios de alteraciones en el hemograma y VSG comparando con otros estudios.

Autor y país	Parámetros*					
	HB ↓	PLT ↓	LEU ↓	Pancitopenia	NEU# ↓	VSG ↑
Sarkari IRÁN [63]	87%	64%		43%		53%
Chufal INDIA [64]	100%	85%	100%	85%		
Gupta INDIA [65]	100%	82%	83%	83%		
Chouchene TÚNEZ [87]	100%	48%	51%	36%		
Chandra INDIA [74]	100%	96%	96%	96%		
Agrawal NEPAL [25]	90%	72%	67%	25%		
Chakrabarti INDIA [88]	71 g/L	83%	61%	58%		
Pace MALTA [26]		108 x10 ⁹ /L	3.7 x10 ⁹ /L		1.5 x10 ⁹ /L	100% (>40 mm)
Bhatia INDIA [92]		95 x10 ⁹ /L	4.1 x10 ⁹ /L	75%		
Petrela ALBANIA [66]	99%	48%			49%	20%
Dhingra INDIA [89]	71 g/L	61%	72%			
Daneshbod IRÁN [67]	75 g/L	84 x10 ⁹ /L	4.4 x10 ⁹ /L			
Kumar IRÁN [90]	70%	30%	10%	10%		25%
Cascio ITALIA [68]	100%	39%	10%	10%		25%
Minodier FRANCIA [70]	70%	70%	42%		1.0 x10 ⁹ /L	73 mm
Al-jurayyan ARABIA [71]	78 g/L	110 x10 ⁹ /L	4.3 x10 ⁹ /L			
Bermejo ESPAÑA	71 g/L	101 x10 ⁹ /L	4.2 x10 ⁹ /L		0.9 x10 ⁹ /L	64 mm
	100%	56%	4.8x10 ⁹ /L		73%	55 mm
	69 g/L	109 x10 ⁹ /L				
	90%	92%	96%	85%	63%	85%

*Se indica la frecuencia de casos aumentados (↑) o disminuidos (↓) y/o los valores medios expresados en las unidades del parámetro.

El secuestro esplénico, la hematopoyesis ineficaz y la hemofagocitosis parecen ser las principales causas de estas **citopenias periféricas**.^[87]

En el caso de la **anemia** en la leishmaniasis visceral, sus posibles causas se pueden encuadrar en varios mecanismos:

1. **Hemólisis o destrucción de los glóbulos rojos y de los eritroblastos**, vinculadas a la hemofagocitosis (medular y esplénica).[105] También se han invocado mecanismos inmunes (anemia hemolítica autoinmune), aumento de la fragilidad osmótica y alteración en la permeabilidad de la membrana de los glóbulos rojos,[105,106] aunque éstos no parecen mecanismos que contribuyan en gran medida a la hemólisis . Todos estos mecanismos podrían provocar la reacción de la médula ósea con hiperplasia eritroide y llevar al aumento de la **ferritina** y de la **LDH** que hemos constatado en nuestro estudio. Los estudios de supervivencia de las células rojas y los análisis ferrocinéticos han sugerido que la hemólisis es la principal causa de anemia en la leishmaniasis,[107] pero también puede haber **expansión del volumen plasmático** asociada con el agrandamiento masivo del bazo.[106] El hallazgo de niveles elevados de eritropoyetina es otro dato que sugiere una eritropoyesis sobrerregulada para compensar la destrucción de glóbulos rojos.[105]
2. **Eritropoyesis ineficaz**. Los cambios diseritropoyéticos [25,87,108,109] y megaloblásticos [25] observados por diferentes autores (también en nuestra serie, pero en escasa cuantía) podrían contribuir a la anemia, pero los estudios ferrocinéticos han demostrado muy poca evidencia de eritropoyesis ineficaz.[107] También algunos autores han detectado fibrosis en biopsias de médula ósea realizadas a pacientes con leishmaniasis visceral.[89]
3. **Bloqueo macrofágico del hierro**. Los estudios ferrocinéticos muestran un nivel reducido de hierro plasmático en presencia de depósitos de hierro aumentados, y sugiere que la hiperplasia reticuloendotelial se acompaña de retención de hierro

anormalmente aumentada por parte de los macrófagos, dato típico de la **anemia de los trastornos crónicos**. [107] Esto puede limitar la respuesta de la médula frente a la hemólisis. [106] Aunque algunos autores indican aumento de reticulocitos, en nuestra serie sólo estaban aumentados en el 22% de los pacientes. En nuestra serie, también el hierro medular muestra un patrón compatible con bloqueo macrofágico en casi la mitad de los pacientes, pero en el resto se observa una disminución de los depósitos, por lo que la **ferropenia** también podría contribuir en un gran número de casos a la anemia. Probablemente la ferropenia no se asocie a un sangrado severo, dato que es sólo frecuente en fases terminales de la leishmaniasis visceral en coincidencia con trombocitopenia severa. [105] El secuestro del hierro en los macrófagos a través de la hepcidina es un mecanismo de defensa frente a las infecciones que limita la disponibilidad de hierro para los microorganismos retirándolo de la circulación y acumulándolo en los macrófagos; desafortunadamente, en el caso de la *Leishmania*, esto beneficia al parásito, pues éste se encuentra dentro del propio macrófago. [43]

En resumen, la anemia en la leishmaniasis visceral es probablemente multifactorial, incluyendo el secuestro esplénico, la hemólisis, la eritropoyesis ineficaz y la anemia de los trastornos crónicos.

A la **leucopenia**, además de la destrucción celular asociada a la hemofagocitosis podría contribuir un factor central de disminución de la mielopoyesis, dada la disminución de la proporción de la serie mieloide a nivel medular, como se ha observado en nuestro estudio y en otros estudios. Aunque puede ser que se trate de una disminución relativa motivada por la hiperplasia de la serie eritroide que acabamos de describir.

En la **trombocitopenia** el factor de hemofagocitosis parece más claro, según nuestros datos, al ser habitual a nivel de la médula ósea la hiperplasia megacariocítica no acompañada

normalmente de ds megacariopoyesis. En ambas citopenias también podría contribuir el secuestro esplénico (y la destrucción asociada a la hemofagocitosis esplénica).

7.3. Valoración de las alteraciones medulares

En la médula ósea de pacientes con leishmaniasis visceral se encuentra aumento de la serie eritroide, aumento de las células plasmáticas, aumento de los macrófagos, aumento de los megacariocitos y disminución de la serie mieloide y la relación mielo-eritroide, así como la presencia de hemofagocitosis de plaquetas y leucocitos. Diferentes autores describen cambios en la **médula ósea** (tabla 29) similares a nuestros hallazgos, como aumento de la celularidad [25,64,71,74,88–90], aumento de serie eritroide [67,74,87,89], inversión de la relación mielo-eritroide [90,92], aumento de las células plasmáticas [25,64,67,74,89,92][88,90] y aumento de los macrófagos [64,71,74,89,92]. También se describen alteraciones cualitativas muy frecuentes, como la presencia de hemofagocitosis [110][67,74,87,89,90,92]. Otras alteraciones descritas con alta frecuencia, como los rasgos megaloblásticos y las alteraciones diseritropoyéticas [25,64,67,71,74,87–89], fueron menos frecuentes en los pacientes de nuestro estudio (9% en ambos parámetros). Por el contrario, cambios muy frecuentes en nuestros pacientes, como el aumento de megacariocitos (en el 68% de los casos), no se habían descrito en estos estudios previos, quizá porque es un parámetro más complicado de cuantificar en los aspirados de médula ósea.

Tabla 29. Frecuencias de alteraciones en médula ósea en otros estudios.

Autor del estudio, país en el que se realiza y referencia (entre corchetes).										
Parámetros*	Chufal	Chouch ene	Chandra	Agrawal	Chakra barti	Bhatia	Dhingra	Danes hbod	Kumar	Al- jurayyan
	INDIA	TÚNEZ	INDIA	NEPAL	INDIA	INDIA	INDIA	IRÁN	IRÁN	ARABIA
	[64]	[87]	[74]	[25]	[88]	[92]	[89]	[67]	[90]	[71]
Celularidad cuantitativa↑	35%		26%	5%	63,9%		77,7%		75,1%	90%
Serie eritroide↑		34%	81,4%				22,2%	78,9%		
Cociente mieloeritroide↓						38%	22,2%		Si	
Linfocitos↑	70%						72,2%			
Plasmáticas↑	70%		96,2%	60%	100%	56%	72,2%	77,9%	8-15%	
Eosinófilos↑		6%	14,8%				16,6%	27,4%		
Blastos↑						6%		2,1%		
Macrófagos↑	70%		100%			81,2%	50%			46%
Parámetros cualitativos (frecuencia)										
Hemofagocitosis		6%	70,3%			75%	11,1%	6,8%	2,8%	Si
Megaloblastosis	10%			55%	27.8%		16,6%			16%
Diseritropoyesis	10%	71%		40%			22.2%			
Disgranulopoyesis		31%	3.7%					4.9%		
Distrombopoyesis		11%								

*en los parámetros cuantitativos se indica la frecuencia de casos aumentados (↑) o disminuidos (↓).

Dada la edad de la población habitualmente afectada por la enfermedad, la mayoría de los estudios se han realizado sobre la población pediátrica, y sólo unos pocos[65] tienen una baja proporción de pacientes pediátricos. La médula ósea y la sangre de los adultos difieren de la

de los niños. Nuestro estudio, centrado sólo en **pacientes adultos**, demuestra resultados similares con estudios previos realizados en población predominantemente pediátrica.

Los hallazgos descritos (hemofagocitosis y aumentos de serie eritroide y megacariocítica, con disminución de serie mieloide) pueden relacionarse con las distintas citopenias que presentan los pacientes con leishmaniasis visceral, tal y como se ha discutido en el apartado de alteraciones hematimétricas. El aumento de células plasmáticas, con la consiguiente hipergammaglobulinemia, estaría relacionado con la estimulación de los linfocitos B que se ha comentado en el apartado de alteraciones bioquímicas.

7.4. Valoración de las alteraciones diferenciales de los subgrupos de pacientes con leishmaniasis visceral

Cuando se comparan los pacientes con leishmaniasis en los que **se observó la *Leishmania*** directamente en la médula ósea con los que no se observó, los primeros presentan médulas más hipercelulares, con más células plasmáticas y con más linfocitos. También hay aumento de IgG, IgM, parámetros que reflejan, como los de médula ósea, un estado de hiperproducción de anticuerpos, quizá en relación con un predominio de la respuesta inmune Th2 sobre la Th1,[47,48]; esta respuesta Th2 es ineficaz frente a la *Leishmania*, lo que aumentaría de alguna manera la agresividad de la leishmaniasis. Por otro lado, el aumento de VSG podría estar en relación con la hiperproducción de anticuerpos. El hecho de no observar las *Leishmanias* en el aspirado es relativamente frecuente y variable según las distintas series, pudiendo estar en relación con factores técnicos (capacitación y entrenamiento del observador, tiempo de observación empleado)[72] o, en condiciones adecuadas de observación, ser aleatorio. No obstante, podemos sugerir la hipótesis de que pueda estar en

relación con un predominio en esos pacientes de la respuesta inmune Th1, que sería más efectiva en la eliminación del parásito intramacrofágico y haría más difícil su observación. Aunque nosotros no lo hemos objetivado en nuestros pacientes, algunos autores señalan en los pacientes con coinfección VIH un mayor porcentaje de observación de los amastigotes en la médula ósea,[111] lo que podría estar de acuerdo con esta hipótesis, al existir en estos pacientes el fenómeno contrario, un predominio de la respuesta inmune Th2 sobre la Th1,[57] como comentaremos a continuación.

Dentro del subgrupo de pacientes **inmunodeprimidos**, los pacientes con **infección VIH**, presentan algunas características diferenciales. En médula ósea se observa una proporción de serie eritroide dentro de los límites normales y aumento de linfocitos, junto con más rasgos displásicos, sin encontrarse diferencias en la proporción de células plasmáticas ni en la de megacariocitos. No se observan diferencias significativas en los recuentos del hemograma, aunque sí se observan valores inferiores en linfocitos y más elevados en plaquetas; en una serie con mayor número de pacientes con coinfección VIH, sí que estas diferencias fueron significativas, y además se describe una anemia más intensa,[111] dato que no se encuentra en nuestro estudio. En la bioquímica sérica destacan IgG y GGT más elevadas, pero con CRP, LDH y transaminasas menores. En el estudio que recoge los datos clínicos de los 11 pacientes con infección VIH del brote de Fuenlabrada, se indica que en el momento del diagnóstico de la leishmaniasis visceral el valor de Linfocitos CD4 era en todos los casos inferior a 400 células/ μ L (rango 4-322) y sólo 1 caso presentaba carga viral indetectable.[103] En los pacientes VIH son hallazgos habituales los rasgos displásicos, los infiltrados linfohistiocitarios, el aumento reactivo de células plasmáticas y el aumento de megacariocitos, con una eritropoyesis en proporciones normales[112] en coincidencia con nuestros hallazgos en las

leishmaniasis en general, excepto la normalidad de la serie eritroide que sí coincidiría con lo observado en nuestros pacientes con coinfección VIH; esto puede complicar en teoría el uso del modelo predictivo del diagnóstico de *Leishmania* que hemos desarrollado (basado en parámetros como el recuento de plasmáticas y la cuantificación de megacariocitos), pues además los pacientes con coinfección VIH no parecen ser diferentes en cuanto a estos parámetros. Las alteraciones diferenciales en la bioquímica sérica (normalidad de transaminasas, menor LDH y menor CRP, junto con IgG más elevada) de estos pacientes indicarían menor daño celular y menor inflamación, por un lado, y por otro una mayor respuesta de inmunidad humoral, quizá en relación con el predominio de la respuesta inmune Th2. Además de afectar la respuesta inmune Th1, la infección VIH también produce un cambio de esa respuesta inmunitaria de tipo Th1 a un patrón de reacción de tipo Th2, aumentando la gravedad de la leishmaniasis.[57] Esta respuesta inmune Th2, basada en la IL-10, produce una limitación de la inflamación y una activación policlonal de linfocitos B, que se transformarán en células plasmáticas y producirán anticuerpos en mayores cantidades.

En los pacientes con **tratamientos inmunosupresores**, se observan algunos datos comunes con los pacientes VIH, como la normalidad de las transaminasas y GGT, pero con el resto de los parámetros muy similares a los otros casos de leishmaniasis.

También presenta rasgos diferenciales el subgrupo de pacientes con leishmaniasis de **origen africano subsahariano**, que suponen un 36% de los casos a pesar de no ser más del 5 % de la población del área de Fuenlabrada. Son pacientes más jóvenes (mediana de 34 años) y la mayoría inmunocompetentes (sólo 10% tenían infección por HIV, frente al 14% de los españoles). Son pacientes que presentaban un menor porcentaje de serie mieloide en médula ósea y un mayor porcentaje de células plasmáticas. A nivel de los recuentos sanguíneos

presentan recuentos de plaquetas más elevados (aunque la media está también por debajo de lo normal) y un VCM menor, este último dato sí habitual en pacientes de origen africano,[113] en relación con factores genéticos (mayor frecuencia de hemoglobinopatías) y dietéticos (ferropenia). También presentan CRP y ALT más elevada, pero sin ninguna otra característica especial, lo que podría sugerir, al contrario que en los pacientes con VIH, mayor inflamación y daño celular. Aunque no se ha podido establecer claramente el motivo de esta elevada incidencia de leishmaniasis, se pueden argumentar varias hipótesis:

1. Los factores medioambientales de riesgo clásico, como la mayor exposición al vector, parecen descartados.[28]
2. Estos pacientes provienen en su mayor parte de zonas donde la *Leishmania infantum* no es endémica (Guinea Ecuatorial y Nigeria), por lo que es probable que exista una carencia de inmunidad adaptativa por ausencia de exposición previa de esa población al parásito.[114]
3. Pueden existir factores genéticos que dificulten la inmunidad celular. Polimorfismos en los genes que regulan IL-10 u otras interleucinas, en IFN-gamma o en TNF-alfa podrían estar implicados. También se han descrito polimorfismos en genes como SLC11A1, que regula la disponibilidad del hierro para la *Leishmania*, más frecuentes en poblaciones africanas. [51,115]

Los fenómenos de **hemofagocitosis** se han observado en más del 50% de los pacientes con leishmaniasis visceral de nuestra serie, aunque sólo se ha detectado diferencia significativa en la presencia de hemofagocitosis de linfocitos y plaquetas. Estos pacientes presentan una mayor celularidad global en la médula ósea, con mayor cantidad de megacariocitos y de macrófagos; estos datos pueden reflejar la reacción medular ante la mayor destrucción de

células por parte los macrófagos y explicaría en parte las citopenias características de la leishmaniasis visceral. A nivel bioquímico estos pacientes también presentan transaminasas más elevadas, quizá en relación con mayor daño hepático asociado a la actividad hemofagocítica. La presencia de hemofagocitosis refleja un trastorno en la función fagocítica de los macrófagos. Experimentos en ratones, demuestran que la infestación intensa de los macrófagos con parásitos de *Leishmania* desencadena fagocitosis de los eritrocitos en el bazo, lo que resulta en anemia.[116] El mecanismo de la activación macrofágica en la hemofagocitosis no se conoce bien y parece relacionarse con el exceso de producción de citoquinas por parte de las células T citotóxicas y NK, siendo el IFN-gamma, el TNF-alfa y varias interleucinas de particular importancia.[117,118] La hemofagocitosis asociada a *Leishmania* podría explicarse por la activación directa de los receptores tipo toll (TLRs) por los parásitos que persisten dentro de los macrófagos. Algunos casos podrían explicarse por mutaciones hipomórficas en los genes defectivos en las HLH genéticas,[119] como los defectos en los genes de las perforinas, por ejemplo la 50delT. [120,121] Esta alteración en concreto es más frecuente en pacientes de origen africano.

El 11% (n=9) de los pacientes con leishmaniasis cumplen los criterios de **linfocitosis hemofagocítica** (HLH), todos ellos pertenecientes a este grupo con hemofagocitosis, y comparten con él las mismas características en los parámetros sanguíneos y medulares, excepto un menor número de plaquetas y aumento de triglicéridos (parámetros que entran en los criterios de HLH). Aunque los pacientes con HLH tienen una mayor frecuencia de hemofagocitosis intensa y de hemofagocitosis de linfocitos y plaquetas, no se han podido objetivar que sea significativo, y los estudios consultados indican que ni la intensidad de la hemofagocitosis ni el tipo de células fagocitadas tienen trascendencia desde el punto de vista

del diagnóstico de esta entidad.[122] De cualquier modo, la mayoría de los casos con criterios de HLH no presentaban la virulencia clínica tan llamativa de los casos de HLH asociados a otras enfermedades infecciosas y tumorales, con muy alta mortalidad.[123] Esta entidad de HLH se ha descrito por diversos autores en casos de leishmaniasis visceral.[59,124] Cuando la HLH está presente y no se observa el parásito, excluir el diagnóstico de leishmaniasis visceral es crucial para iniciar un tratamiento adecuado, sobre todo teniendo en cuenta la gravedad del cuadro que se asocia a otras etiologías. Por todo ello es muy importante informar la presencia de hemofagocitosis en el estudio medular, bien porque puede orientar a un diagnóstico de leishmaniasis visceral, bien porque oriente al diagnóstico de HLH de otra etiología.

Al comparar pacientes con leishmaniasis visceral y pacientes con **síndrome mielodisplásico**, algunos de los parámetros diferenciales siguen siendo significativos, como el alto porcentaje de células plasmáticas y macrófagos en la médula ósea, así como la leucopenia y la trombocitopenia en los recuentos celulares, y aumento de IgG, ferritina, LDH, CRP, AST y triglicéridos. En esta comparación, no hay diferencias en la proporción de eritroblastos (serie eritroide) y células mieloides (serie mieloide) en la médula, ni en el valor de la hemoglobina. Es de destacar que la hiperplasia eritroide en la médula ósea y la anemia son hallazgos comunes en los síndromes mielodisplásicos,[94] lo que podría justificar esta diferencia. Por ello, todo estudio medular de un paciente con sospecha de síndrome mielodisplásico en el que se observase un aumento de células plasmáticas debiera ponernos sobre aviso de considerar la leishmaniasis, entre otros, como uno de los diagnósticos diferenciales.

7.5. Valoración del modelo predictivo diagnóstico de leishmaniasis visceral

7.5.1. Integración de los resultados en el proceso diagnóstico de la leishmaniasis visceral

En nuestro estudio, al igual que otros,[63,69,91] se constató una sensibilidad diagnóstica relativamente baja para la observación de la *Leishmania* en el aspirado de la médula ósea. El diagnóstico rápido de la leishmaniasis visceral es importante para iniciar el tratamiento tan pronto como sea posible, y los métodos de alta sensibilidad no son rápidos ni siempre están disponibles. En las zonas endémicas en las que la enfermedad no es muy prevalente o no es endémica, los cambios descritos podrían orientar hacia un diagnóstico de la leishmaniasis visceral, incluso en casos en los que no hubiera sospecha clínica.

Este estudio no sólo confirma muchas de las alteraciones de la sangre y de la médula ósea descritas anteriormente en pacientes con leishmaniasis visceral, sino que también destaca los parámetros más importantes en la realización del diagnóstico diferencial. Por un lado, en pacientes con fiebre prolongada de origen desconocido, sobre todo con esplenomegalia asociada, las diferencias descritas entre los casos de leishmaniasis visceral y los que finalmente no la presentaban, podrían orientar el diagnóstico de una leishmaniasis visceral. Por otro lado, en pacientes pancitopénicos, algunos parámetros también diferencian entre los casos de leishmaniasis visceral y los de otras causas frecuentes de citopenias, como son los síndromes mielodisplásicos.

El diagnóstico de la leishmaniasis visceral se realiza mediante la demostración de la presencia del parásito en los tejidos humanos o por sus consecuencias inmunológicas. Pero esto no siempre se logra en un tiempo adecuado para tratar correctamente esta enfermedad

potencialmente letal. La observación directa del parásito, además de falsos negativos (observación de la médula ósea), puede tener riesgos (aspiración esplénica en determinados contextos). Las pruebas con más alta sensibilidad, como la PCR de *Leishmania* (en médula ósea u otros tejidos) y las pruebas serológicas de ELISA, se retrasan en el tiempo, tal y como hemos podido confirmar en nuestra serie (media de 7 y 6 días, respectivamente). Las pruebas serológicas rápidas, como el RDT basado en rK39, que ofrecen buenos resultados con alta sensibilidad y especificidad en diversos contextos, no se han dado buenos resultados en nuestra área de salud, con menor sensibilidad (51%). Podemos hipotetizar que esta baja sensibilidad podría estar en relación con el corto tiempo de evolución de la enfermedad en nuestros pacientes, en los que el RDT basado en rK39 se realizaba rápidamente debido a la alta sospecha de leishmaniasis en nuestro medio, pero en cualquier caso es un hecho constatado en nuestra amplia serie de pacientes.

Teniendo en cuenta todo esto, se ha planteado integrar nuestro modelo diagnóstico dentro de un proceso diagnóstico y terapéutico global para los pacientes con fiebre prolongada y sospecha de leishmaniasis visceral.

7.5.2. Aplicación del modelo predictivo de médula ósea integrado en el proceso diagnóstico y terapéutico en un paciente con fiebre prolongada y sospecha de leishmaniasis visceral

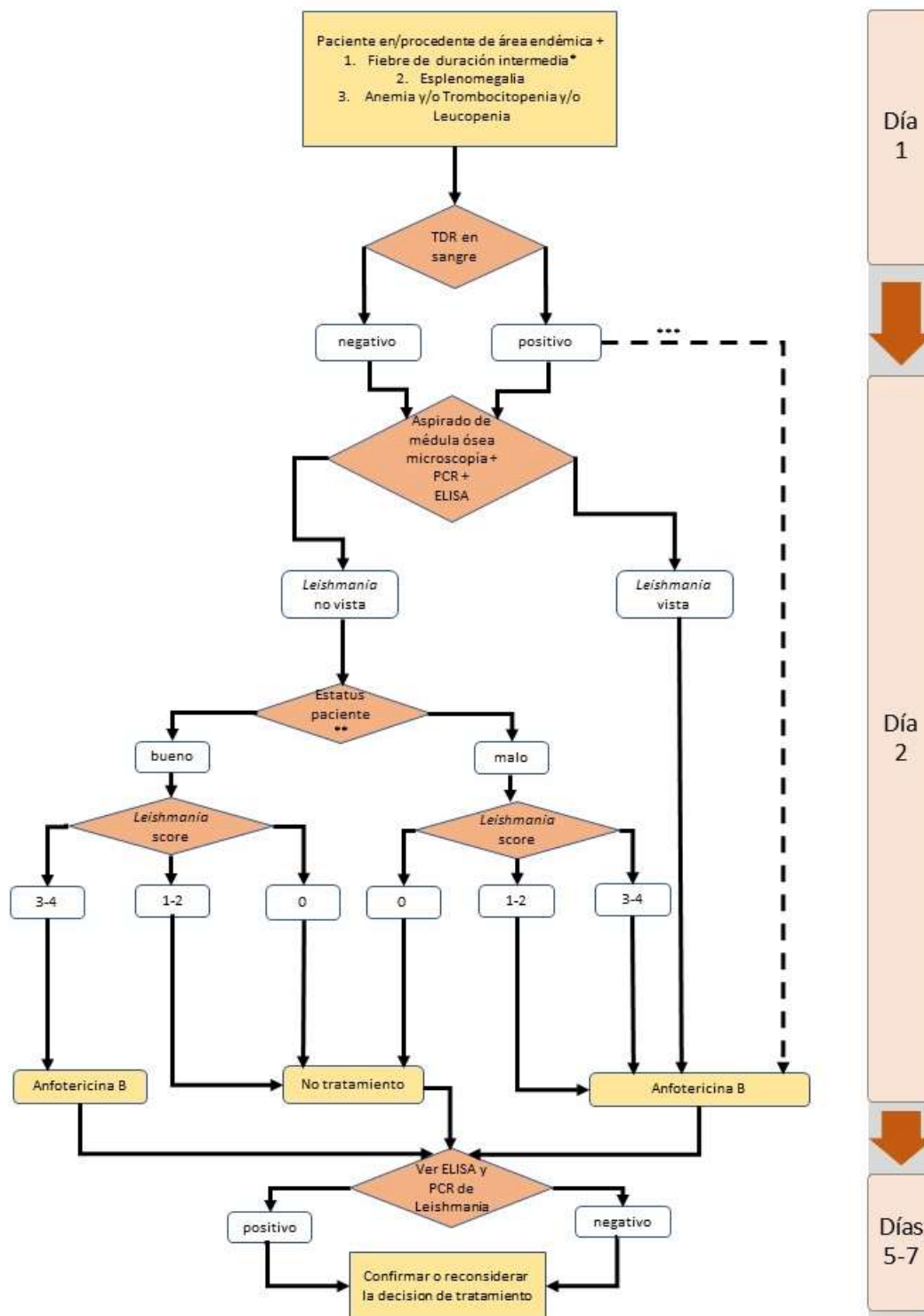
En pacientes con alta sospecha diagnóstica de leishmaniasis visceral, nuestro modelo diagnóstico puede estratificar la probabilidad de tener leishmaniasis visceral cuando el parásito no se observa en el aspirado de la médula ósea, ayudando a tomar una decisión

terapéutica en el momento oportuno sin tener que esperar al resultado de la PCR de *Leishmania* o la serología ELISA. El sistema de puntuación o score derivado del modelo, integrado en un flujo de trabajo diagnóstico, podría ser también útil en áreas endémicas en las que no se disponga de PCR ni de técnicas serológicas rápidas con alta sensibilidad, y ayudaría en la decisión de tratar a un paciente cuando no podemos demostrar la presencia de *Leishmania* rápidamente.

Se propone un **flujo de trabajo diagnóstico** (esquema 4) en pacientes con alta sospecha de leishmaniasis visceral (fiebre de duración intermedia, esplenomegalia y citopenia/s):

1. Comenzar con la **prueba rápida** (TDR) en sangre para la leishmaniasis visceral, el **aspirado de médula ósea** que incluye la muestra para **PCR** de *Leishmania*, cuyo resultado llegará con posterioridad, y la serología **ELISA**.
2. Si la prueba sérica rápida en sangre es positiva o se observa *Leishmania* en la médula ósea, el paciente recibirá tratamiento con anfotericina B.
3. De lo contrario, calculamos el **“score” de *Leishmania*** y evaluamos el **estado del paciente**. El mal estado del paciente se define por al menos uno de los siguientes datos: inestabilidad hemodinámica, anemia sintomática o trombocitopenia, neutropenia grave ($< 0.5 \times 10^9$ neutrófilos/L), presencia de SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), fiebre mal tolerada o comorbilidades.
4. Los pacientes con **baja probabilidad** de tener *Leishmania* (puntuación de 0 puntos) no recibirán tratamiento específico con Anfotericina B.

5. Los pacientes con **probabilidad intermedia** (1-2 puntos), solo se tratarán con Anfotericina B si presentan mal estado. Los pacientes con mejor estado clínico esperarán el resultado de la PCR de *Leishmania*.
6. Los pacientes con puntuación de **alta probabilidad** (3-4 puntos) serán tratados con anfotericina B.
7. Cuando llegue el resultado de la PCR de *Leishmania* o el ELISA, la decisión de tratamiento podría cambiarse si el diagnóstico es diferente de lo esperado según este árbol de decisión.



Esquema 4. Diagrama de flujo propuesto para el manejo de pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis. * Una vez descartadas causas comunes como infecciones virales, fiebre Q, rickettsiosis, brucelosis, malaria y endocarditis. ** Mal estado definido por al menos uno de los siguientes: inestabilidad hemodinámica, anemia sintomática o trombocitopenia, neutropenia grave ($< 500/\mu\text{L}$), presencia de SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), fiebre mal tolerada o comorbilidades. *** Si la prueba rápida en sangre es positiva y el paciente presenta mal estado, iniciar el tratamiento con anfotericina B.

7.6. Limitaciones del estudio

En primer lugar, nuestro estudio ha sido realizado en un área geográfica muy localizada en la que se han concentrado un gran número de casos de leishmaniasis dentro de un brote, contexto epidemiológico no habitual en nuestro país. Desconocemos si el modelo elaborado podría ser extrapolable a otras localizaciones geográficas, a otros genotipos de *Leishmania infantum* o especies de *Leishmania* y a otras circunstancias epidemiológicas.

Este estudio también puede estar limitado por basarse en una recogida retrospectiva de datos para desarrollar un modelo predictivo de diagnóstico. Aunque la recogida prospectiva de datos es el procedimiento más recomendable, sobre todo para evitar la pérdida de datos y de potenciales variables predictoras, el uso de conjuntos de datos ya constituidos, como los registros de la práctica clínica rutinaria, utilizados en nuestro estudio, puede ser también válido.[85]

Otras limitaciones se relacionan con la validación del modelo. La validación interna se puede considerar una parte necesaria del desarrollo del modelo, por lo que se recomienda realizar una validación externa del mismo para evaluar su desempeño en otro conjunto diferente de datos. Aunque la validación externa utilizada (dividir el conjunto de datos en 2 grupos no aleatorios y utilizar uno para el desarrollo y otro para la validación del modelo) es una práctica adecuada (especialmente cuando hay una diferencia temporal entre los 2 grupos), tienen más fuerza los diseños de validación que usan un conjunto de datos de otro estudio totalmente separado.[85] Por todo ello, y teniendo también en cuenta las características epidemiológicas y geográficas del estudio, se considera recomendable realizar una validación externa en otras circunstancias epidemiológicas, tanto en nuestro país como en otros países.

Respecto a la aplicación práctica del modelo, debe señalarse la posibilidad de que existan diferencias en los resultados de probabilidad aplicando el nomograma respecto al “score”, como ocurre en el caso número 3 de los ejemplos indicados en el apartado 6.3 de elaboración del modelo. En este caso con diagnóstico final de leishmaniasis, la probabilidad obtenida a partir del hemograma fue del 78%, mientras que con el “score” fue del 60% (puntuación de 2, con probabilidad intermedia). El “score”, muy sencillo de usar, tiene la limitación de dar sólo 5 niveles de probabilidad de 0 a 100%. Por otro lado, el nomograma va a proporcionar un valor más exacto de probabilidad, pero su cálculo va a resultar algo más complejo. Cualquier simplificación de un modelo predictivo puede llevar, debido al redondeo, a alguna pérdida de exactitud predictiva.[85]

Algunos datos cuantitativos en médula ósea (celularidad global, megacariocitos) podrían evaluarse de manera más exacta analizando la histopatología de una muestra de biopsia de médula ósea en lugar del aspirado. Este estudio no se realiza de manera habitual al constituir una prueba más agresiva para el paciente. Algunos de los estudios realizados por otros autores incluyen este tipo de muestra, con resultados similares.[90] Por nuestra parte, se han seguido de manera sistemática las recomendaciones de la ISLH y de los autores más reputados en la evaluación del aspirado de médula ósea.[96–98]

Como nuestro modelo se basa en las proporciones de las células de la médula ósea, el uso del inmunofenotipo mediante citometría de flujo para obtener estos datos podría ser de gran valor. El inmunofenotipo es una técnica más objetiva y reproducible en la caracterización de las diferentes poblaciones celulares de la médula ósea. Desafortunadamente, esta técnica se realizó sólo en algunas de nuestras muestras (por ejemplo, si también había sospecha de síndrome mielodisplásico o linfoma). En estos casos, las proporciones celulares por

inmunofenotipo correspondían a las obtenidas en los recuentos citológicos, pero en diferentes rangos, mostrando una mayor proporción de la serie mieloide y menor proporción de células plasmáticas, debido a la dilución con la sangre periférica o por las técnicas de procesamiento. El inmunofenotipo es también una técnica más cara y debe ser referida a otros laboratorios en muchos hospitales. De todos modos, la elaboración de un modelo de diagnóstico basado en recuentos celulares obtenidos por citometría de flujo podría ser muy interesante. Incluso reconociendo las limitaciones de la citología de la médula ósea (número limitado de células observadas, subjetividad del observador y variabilidad de criterios entre centros) nuestros resultados indican que puede ser una técnica útil en la mayoría de los laboratorios para orientar el diagnóstico de la leishmaniasis visceral cuando no se observa el parásito.

8. CONCLUSIONES

1. En un contexto epidemiológico de alta prevalencia de la leishmaniasis, los siguientes parámetros pueden considerarse útiles para discriminar entre pacientes con y sin leishmaniasis visceral:

- Aumento del % de **células plasmáticas** en la médula ósea.
- Aumento del % de **macrófagos** en la médula ósea.
- Aumento de **megacariocitos** en la médula ósea.
- Presencia de **hemofagocitosis de leucocitos y plaquetas** en la médula ósea.
- Aumento del % de **serie eritroide** en la médula ósea (sin displasia asociada) o la concomitante disminución del % de **serie mieloide**.
- **Pancitopenia** (principalmente leucopenia y trombocitopenia, y también anemia si no se acompaña de displasia significativa).
- Aumento de **IgG sérica**.
- Aumento de **LDH, Triglicéridos, AST, CRP y ferritina sérica**.

2. Los subgrupos de pacientes con leishmaniasis que presentan características distintivas propias son:

- Los pacientes en los que **no se observó la *Leishmania***, en los que se objetiva una menor producción de anticuerpos.

- Los pacientes con **infección VIH**, con alteraciones medulares similares a las de otros pacientes VIH sin leishmaniasis.
 - Los pacientes de **origen africano subsahariano**, que tienen una incidencia anormalmente elevada de leishmaniasis visceral y las alteraciones medulares características de la leishmaniasis visceral más acentuadas.
 - Los pacientes que cumplen criterios de **Linfohistiocitosis Hemofagocítica**.
3. A partir de los hallazgos diferenciales en médula ósea se ha elaborado un **modelo predictivo diagnóstico** que incluye tres de los parámetros discriminativos de la médula ósea (**% de serie mieloide, % de células plasmáticas y cuantificación de megacariocitos**) y que nos permite establecer la probabilidad de tener Leishmaniasis visceral en caso de que el parásito *Leishmania* no se observe en la médula ósea.
- Partiendo del modelo se han desarrollado un **nomograma** y un sistema diagnóstico de puntuación o **score** de 5 puntos (0 a 4) que permiten calcular con facilidad la probabilidad de tener leishmaniasis visceral. Los pacientes con score elevado (3-4 puntos) presentarían leishmaniasis visceral con una probabilidad elevada (88-100%), mientras que los pacientes con score bajo (0 puntos) presentarían una probabilidad nula (0%) de tener leishmaniasis visceral.
 - Se ha confirmado el buen rendimiento del modelo realizando una **validación externa**.
 - Se puede integrar el modelo dentro de dentro de un **procedimiento global de diagnóstico clínico y toma de decisiones** en casos de sospecha de leishmaniasis visceral.

9. BIBLIOGRAFÍA:

1. Poinar G, Poinar R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese Amber. *Protist*. 2004 Sep;155(3):305–10.
2. Poinar G. Evolutionary History of Terrestrial Pathogens and Endoparasites as Revealed in Fossils and Subfossils. *Advances in Biology*. 2014;2014:1–29.
3. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* [Internet]. 2017 Dec [cited 2019 Aug 19];10(1). Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2028-5>
4. Gibson MaryE. The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania Donovanii*. *Medical History*. 1983 Apr;27(2):203–13.
5. Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *BMJ*. 1903 Nov 14;2(2237):1261–2.
6. Rogers L. The Milroy Lectures on kala-azar, Delivered before the Royal College of Physicians of London. *BMJ*. 1907 Mar 9;1(2410):557–62.
7. Botet-Fregola J, Portús-Vinyeta M. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). *Rev San Hig Púb*. 1993 Jul;67(4):255–66.
8. Théodoridès J. [Historical note on the discovery of cutaneous leishmaniasis transmission by *Phlebotomus*]. *Bull Soc Pathol Exot*. 1997;90(3):177–8.
9. World Health Organization. Control of the leishmaniases. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2010;(949):xii–xiii, 1–186, back cover.
10. Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the leishmaniases. *Elife*. 2014 Jun 27;3.
11. Conteh L, Engels T, Molyneux DH. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *The Lancet*. 2010 Jan;375(9710):239–47.
12. Pace D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*. 2014 Nov;69:S10–8.
13. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Kirk M, editor. *PLoS ONE*. 2012 May 31;7(5):e35671.
14. Roberts DJ. Hematologic Changes Associated with Specific Infections in the Tropics. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016 Apr;30(2):395–415.

15. Silveira FT, Corbett CEP. Leishmania chagasi Cunha & Chagas, 1937: indigenous or introduced? A brief review. Revista Pan-Amazônica de Saúde [Internet]. 2010 Jun [cited 2019 Aug 20];1(2). Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=en
16. 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). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2017 Jan 11;96(1):24–45.
17. Salud Madrid. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid. 2011 Nov;17(11). Available from: <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM020077.pdf>
18. Amela C, Suarez B, Isidoro B, Sierra MJ, Santos S, Simon F. Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España [Internet]. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2012. Available from: <https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf>
19. 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.
20. Suárez Rodríguez B, Isidoro Fernández B, Santos Sanz S, Sierra Moros MJ, Molina Moreno R, Astray Mochales J, et al. [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. Rev Esp Salud Publica. 2012 Dec;86(6):555–64.
21. 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. Veterinary Parasitology. 2012 Nov;190(1–2):268–71.
22. Jimenez-Marco T, Fisa R, Girona-Llobera E, Cancino-Faure B, Tomás-Pérez M, Berenguer D, et al. Transfusion-transmitted leishmaniasis: a practical review: Transfusion-transmitted leishmaniasis. Transfusion. 2016 Mar;56:S45–51.
23. St. C. Symmers W. Leishmaniasis acquired by contagion. The Lancet. 1960 Jan;275(7116):127–32.
24. Cruz I, Morales M, Nogueira I, Rodriguez A, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. The Lancet. 2002 Mar;359(9312):1124–5.
25. Agrawal Y, Sinha AK, Upadhyaya P, Kafle SU, Rijal S, Khanal B. Hematological profile in visceral leishmaniasis. International Journal of Infection and Microbiology. 2013 Jul 20;2(2):39–44.

26. Pace D, Williams TN, Grochowska A, Betts A, Attard-Montalto S, Boffa MJ, et al. Manifestations of paediatric *Leishmania infantum* infections in Malta. *Travel Med Infect Dis.* 2011 Jan;9(1):37–46.
27. Subdirección de Promoción de la Salud y Prevención. Leishmaniasis en la Comunidad de Madrid. Documentos Técnicos de Salud Pública [Internet]. Comunidad de Madrid; 2014. Available from: http://www.informesdesalud.sanidadmadrid.org/docs/DocumentoTecnicoLeishmaniasis_11junio14.pdf
28. 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 Jul 25;18(30):20546.
29. Madrid (Comunidad Autónoma), Consejería de Sanidad, Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: el papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid, Dirección General de Salud Pública; 2017.
30. Ruiz-Fons F, Ferroglio E, Gortázar C. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro Surveill.* 2013 Jul 25;18(30):20541.
31. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Veterinary Parasitology.* 2014 May;202(3–4):296–300.
32. Ruiz EA, Arnáez AA, Monzo LM, Gómez AE, Calle AI, Ureña SD la F, et al. Análisis espacial de un brote de leishmaniasis en el sur del Área metropolitana de la Comunidad de Madrid. 2009-2013. *ResearchGate.* 2014 Jun 15;14(1):39–53.
33. 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). *Clinical Microbiology and Infection.* 2015 Mar;21(3):269–73.
34. Gomez-Barroso D, Herrador Z, San Martín JV, Gherasim A, Aguado M, Romero-Maté A, et al. Spatial distribution and cluster analysis of a leishmaniasis outbreak in the south-western Madrid region, Spain, September 2009 to April 2013. *Eurosurveillance* [Internet]. 2015 Feb 19 [cited 2019 Aug 23];20(7). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2015.20.7.21037>
35. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013 Jul 25;18(30):20545.
36. Carrillo E, Moreno J, Cruz I. What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid? *Trends Parasitol.* 2013 Dec;29(12):579–80.

37. Sevá A da P, Martcheva M, Tuncer N, Fontana I, Carrillo E, Moreno J, et al. Efficacies of prevention and control measures applied during an outbreak in Southwest Madrid, Spain. *PLoS ONE*. 2017;12(10):e0186372.
38. Jesus García Martínez, Jerónimo Jaqueti Aroca, M^a Isabel García Arata, Laura Molina Esteban. *Boletín epidemiológico Hospital Universitario de Fuenlabrada. Área de Microbiología Laboratorio Clínico Hospital Universitario de Fuenlabrada*;
39. *Salud Madrid. Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid*. 2017 Nov;23(11). Available from: <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM020199.pdf>
40. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol*. 2013;82:155–84.
41. Eduardo Varela Miranda R, Dib Díaz-Granados JC, Pérez-Arellano JL, Muro Álvarez A. Infecciones difícilmente transmisibles I : Leishmaniosis. In: Muro Álvarez A, Pérez-Arellano JL, editors. *Manual de enfermedades importadas* [Internet]. 2012. p. 451–60. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9788445802069000394>
42. Davidson RN. Leishmaniasis. In: Cohen J MB, FRCP, FRCPE, FRCPath, FMedSci, Powderly WG MD, FRCPI, Opal SM MD, editors. *Infectious Diseases* [Internet]. 2017. p. 1059-1064.e1. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9780702062858001234>
43. Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiology*. 2015 Jan;10(1):111–29.
44. Aronson NE, Magill AJ. Leishmaniasis. In: Ryan ET MD, FACP, FIDSA, FASTMH, FAAM, Hill DR MD, DTM & H, FRCP, FFTM (RCPS Glasg), FASTMH, Solomon T BA, BM, BCH, FRCP, DCH, DTM & H, PhD, Aronson NE MD, Endy TP MD, MPH, FACP, FIDSA, FASTMH, editors. *Hunter’s Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* [Internet]. 2020. p. 776–98. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9780323555128001046>
45. 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.
46. Ribeiro HAL, Maioli TU, de Freitas LM, Tieri P, Castiglione F. Modeling Immune Response to *Leishmania* Species Indicates Adenosine As an Important Inhibitor of Th-Cell Activation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2017 Jul 20 [cited 2019 Sep 7];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00309/full>
47. Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*. 2007 Sep;28(9):378–84.
48. Melby PC. Leishmaniasis (*Leishmania*). In: Kliegman RM MD, St Geme JW MD, Blum NJ MD, Shah SS MD, MSCE, Tasker RC MBBS, MD, Wilson KM MD, MPH, editors. *Nelson*

Textbook of Pediatrics [Internet]. 2020. p. 1839-1844.e1. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9780323529501003114>

49. Singh OP, Stober CB, Singh AK, Blackwell JM, Sundar S. Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10):e1874.
50. 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.
51. Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol*. 2009 May;31(5):254–66.
52. Moral L, Rubio EM, Moya M. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacantí region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 Apr;96(2):129–32.
53. Ali A, Ashford RW. Visceral leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relation of infection to disease in an endemic area. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994 Jun;88(3):289–93.
54. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014;6:147–54.
55. Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, et al. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. *Microbes Infect*. 2005 Oct;7(13):1370–5.
56. van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):286–99.
57. 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.
58. Ferreras González A, García Cuartero I, Gato Díez A, Ferreras Fernández P. Infecciones por protozoos hemoflagelados: leishmaniasis, enfermedad de Chagas y tripanosomiasis africana. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2014 Apr;11(54):3194–207.
59. 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.
60. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Sep;9(5):951–8.

61. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Oct;86(5):505–7.
62. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America.* 2012 Jun;26(2):309–22.
63. Sarkari B, Naraki T, Ghatee MA, Abdolahi Khabisi S, Davami MH. Visceral Leishmaniasis in Southwestern Iran: A Retrospective Clinico-Hematological Analysis of 380 Consecutive Hospitalized Cases (1999-2014). *PLoS ONE.* 2016;11(3):e0150406.
64. Chufal SS. Role of Haematological Changes in Predicting Occurrence of Leishmaniasis- A Study in Kumaon Region of Uttarakhand. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 30]; Available from: http://jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2016&volume=10&issue=5&page=EC39&issn=0973-709x&id=7885
65. Gupta DS, P DB, Neeraj K. Kala Azar in Uttrakhand - A Clinical Study. *International Journal of Scientific Research* [Internet]. 2016 Aug 23 [cited 2016 Oct 30];5(7). Available from: <http://worldwidejournals.in/ojs/index.php/ijsr/article/view/10493>
66. Petrela R, Kuneshka L, Foto E, Zavalani F, Gradoni L. Pediatric visceral leishmaniasis in Albania: a retrospective analysis of 1,210 consecutive hospitalized patients (1995-2009). *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Sep 7;4(9).
67. Daneshbod Y, Dehghani SJ, Daneshbod K. Bone marrow aspiration findings in kala-azar. *Acta Cytol.* 2010 Feb;54(1):12–24.
68. Cascio A, Colomba C, Antinori S, Orobello M, Paterson D, Titone L. Pediatric visceral leishmaniasis in Western Sicily, Italy: a retrospective analysis of 111 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Apr;21(4):277–82.
69. Shahriar D, Reza MP, Reza AM, Faramarz S. Cytological clues of bone marrow findings in Kala-Azar. *Diagn Cytopathol.* 1999 Apr;20(4):208–11.
70. Minodier P, Piarroux R, Garnier JM, Unal D, Perrimond H, Dumon H. Pediatric visceral leishmaniasis in southern France. *Pediatr Infect Dis J.* 1998 Aug;17(8):701–4.
71. 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 Jun;41(3):143–8.
72. da Silva MRB, Stewart JM, Costa CHN. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jun;72(6):811–4.
73. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(1):79–99.

74. Chandra H, Chandra S, Kaushik RM. Visceral leishmaniasis with associated common, uncommon, and atypical morphological features on bone marrow aspirate cytology in nonendemic region. *J Trop Med*. 2013;2013:861032.
75. Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1983 May;32(3):475–9.
76. Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(1):66–8.
77. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet*. 2018 Sep;392(10151):951–70.
78. Kumar VD, Verma PRP, Singh SK. New insights into the diagnosis and chemotherapy for visceral leishmaniasis. *Curr Drug Deliv*. 2014;11(2):200–13.
79. Sakkas H, Gartzonika C, Levidiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016 Mar;53(1):8–16.
80. Bangert M, Flores-Chávez MD, Llanes-Acevedo IP, Arcones C, Chicharro C, García E, et al. Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(3): e0006277.
81. de Ruyter CM, van der Veer C, Leeflang MMG, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol*. 2014 Sep;52(9):3147–55.
82. Sudarshan M, Sundar S. Parasite load estimation by qPCR differentiates between asymptomatic and symptomatic infection in Indian visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Sep;80(1):40–2.
83. Burza S, Sinha PK, Mahajan R, Lima MA, Mitra G, Verma N, et al. Five-year field results and long-term effectiveness of 20 mg/kg liposomal amphotericin B (Ambisome) for visceral leishmaniasis in Bihar, India. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):e2603.
84. Murray HW. Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Mar;86(3):434–40.
85. Moons KGM, Altman DG, Reitsma JB, Ioannidis JPA, Macaskill P, Steyerberg EW, et al. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis Or Diagnosis (TRIPOD): Explanation and Elaboration. *Annals of Internal Medicine*. 2015 Jan 6;162(1):W1.
86. Toll DB, Janssen KJM, Vergouwe Y, Moons KGM. Validation, updating and impact of clinical prediction rules: A review. *Journal of Clinical Epidemiology*. 2008 Nov;61(11):1085–94.

87. Chouchene S, Braham N, Bouatay A, Hizem S, Berriri S, Eljemai A, et al. [Hematologic abnormalities in infantile visceral leishmaniasis]. *Arch Pediatr*. 2015 Nov;22(11):1107–11.
88. Chakrabarti S, Sarkar S, Goswami BK, Sarkar N, Das S. Clinico-hematological profile of visceral leishmaniasis among immunocompetent patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2013 Mar;44(2):143–9.
89. Dhingra KK, Gupta P, Saroha V, Setia N, Khurana N, Singh T. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral Kala Azar: a review. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010 Mar;53(1):96–100.
90. Kumar PV, Vasei M, Sadeghipour A, Sadeghi E, Soleimanpour H, Mousavi A, et al. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007 Feb;29(2):77–80.
91. Lal CS, Verma RB, Verma N, Siddiqui NA, Rabidas VN, Pandey K, et al. Hypertriglyceridemia: a possible diagnostic marker of disease severity in visceral leishmaniasis. *Infection*. 2016 Feb;44(1):39–45.
92. Bhatia P, Haldar D, Varma N, Marwaha R, Varma S. A case series highlighting the relative frequencies of the common, uncommon and atypical/unusual hematological findings on bone marrow examination in cases of visceral leishmaniasis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011;3(1):e2011035.
93. Rivero A, Zambrana JL, Pachón J. [Fever of intermediate duration]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003 Mar;21(3):147–52.
94. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937–51.
95. Lehmborg K, Nichols KE, Henter J-I, Girschikofsky M, Greenwood T, Jordan M, et al. Consensus recommendations for the diagnosis and management of hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with malignancies. *Haematologica*. 2015 Aug;100(8):997–1004.
96. Lee S-H, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC, International Council for Standardization In Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol*. 2008 Oct;30(5):349–64.
97. Theil KS. Bone Marrow Processing and Normal Morphology. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, editors. *Laboratory Hematology Practice* [Internet]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012 [cited 2019 Jul 30]. p. 279–99. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781444398595.ch22>

98. Bates I, Burthem J. Bone Marrow Biopsy. In: Dacie and Lewis Practical Haematology [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2019 Jul 30]. p. 112–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702066962000072>
99. Rice A, Bain BJ. Cytochemical, Immunocytochemical, Histochemical, and Immunohistochemical Staining of Bone Marrow and Peripheral Blood. In: Kottke-Marchant K, Davis BH, editors. Laboratory Hematology Practice [Internet]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012 [cited 2019 Aug 26]. p. 300–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781444398595.ch23>
100. Bain BJ, Clark DM, Wilkins BS. Bone Marrow Pathology [Internet]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009 [cited 2019 Aug 26]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781444309782>
101. Phiri KS, Calis JCJ, Kachala D, Borgstein E, Waluza J, Bates I, et al. Improved method for assessing iron stores in the bone marrow. *Journal of Clinical Pathology*. 2009 Aug 1;62(8):685–9.
102. Fernández Félix, Borja Manuel. Validación interna de modelos predictivos de regresión logística. Comando Validation (Stata) [Internet] [Trabajo Fin de Máster]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2018. Available from: https://eprints.ucm.es/49486/1/TFM_Borja%20Fern%C3%A1ndez%20Felix.pdf
103. Horrillo L, Castro A, Matía B, Molina L, García-Martínez J, Jaqueti J, et al. Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned? *Parasites & Vectors* [Internet]. 2019 Dec [cited 2019 Aug 30];12(1). Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3628-z>
104. Silva-Barrios S, Smans M, Duerr CU, Qureshi ST, Fritz JH, Descoteaux A, et al. Innate Immune B Cell Activation by *Leishmania donovani* Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. *Cell Reports*. 2016 Jun 14;15(11):2427–37.
105. Goto Y, Cheng J, Omachi S, Morimoto A. Prevalence, severity, and pathogenesis of anemia in visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*. 2017 Feb;116(2):457–64.
106. Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2010 Sep;26(3):78–82.
107. Pippard MJ, Moir D, Weatherall DJ, Lenicker HM. Mechanism of anaemia in resistant visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1986 Jun;80(3):317–23.
108. Wickramasinghe SN, Abdalla SH, Kasili EG. Ultrastructure of bone marrow in patients with visceral leishmaniasis. *J Clin Pathol*. 1987 Mar;40(3):267–75.
109. Sheikha A. Dyserythropoiesis in 105 patients with visceral leishmaniasis. *Lab Hematol*. 2004;10(4):206–11.

110. Mokhtari M, Kumar PV. Visceral leishmaniasis-associated hemophagocytosis: a single center experience. *Arch Iran Med*. 2013 Aug;16(8):471–3.
111. Henn GA de L, Ramos Júnior AN, Colares JKB, Mendes LP, Silveira JGC, Lima AAF, et al. Is Visceral Leishmaniasis the same in HIV-coinfected adults? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2018 Mar;22(2):92–8.
112. Liebman HA, Tulpule A. Hematologic Manifestations of HIV/AIDS. In: Hoffman M Ronald, Benz M Edward J, Silberstein M Leslie E, Heslop Ds (Hon) Helen E, MD, Weitz M Jeffrey I, Anastasi M John, et al., editors. *Hematology: Basic Principles and Practice* [Internet]. Seventh Edition. 2018. p. 2262–77. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9780323357623001578>
113. Ayemoba O, Hussain N, Umar T, Ajemba-Life A, Kene T, Edom U, et al. Establishment of reference values for selected haematological parameters in young adult Nigerians. Mayne ES, editor. *PLOS ONE*. 2019 Apr 2;14(4):e0213925.
114. 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.
115. Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, White JK, Cordell HJ, Howson JMM, et al. SLC11A1 (formerly NRAM1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *European Journal of Human Genetics*. 2004 Jan;12(1):66–74.
116. Morimoto A, Omachi S, Osada Y, Chambers JK, Uchida K, Sanjoba C, et al. Hemophagocytosis in Experimental Visceral Leishmaniasis by *Leishmania donovani*. *PLOS Negl Trop Dis*. 2016 Mar 4;10(3):e0004505.
117. Arber DA. Bone Marrow. In: Goldblum M John R, Lamps M Laura W, McKenney M Jesse K, Myers M Jeffrey L, editors. *Rosai and Ackerman’s Surgical Pathology* [Internet]. Eleventh Edition. 2018. p. 1658–737. Available from: <https://www.clinicalkey.es/#!/content/3-s2.0-B9780323263399000391>
118. Morimoto A, Nakazawa Y, Ishii E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: Pathogenesis, diagnosis, and management. *Pediatr Int*. 2016 Sep;58(9):817–25.
119. Janka GE, Lehmborg K. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: pathogenesis and treatment. *Hematology*. 2013 Dec 1;2013(1):605–11.
120. Gholam C, Grigoriadou S, Gilmour KC, Gaspar HB. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in the genetic basis, diagnosis and management: Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clinical & Experimental Immunology*. 2011 Mar;163(3):271–83.
121. Molleran Lee S. Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Journal of Medical Genetics*. 2004 Feb 1;41(2):137–44.

122. Ho C, Yao X, Tian L, Li F-Y, Podoltsev N, Xu ML. Marrow assessment for hemophagocytic lymphohistiocytosis demonstrates poor correlation with disease probability. *Am J Clin Pathol*. 2014 Jan;141(1):62–71.
123. Henter J-I, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric Blood & Cancer*. 2007 Feb;48(2):124–31.
124. Kilani B, Ammari L, Kanoun F, Ben Chaabane T, Abdellatif S, Chaker E. Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis. *Int J Infect Dis*. 2006 Jan;10(1):85–6.

10. ANEXOS

10.1. Publicaciones del autor relacionadas con la tesis

10.1.1. Artículo principal relacionado con la tesis

1. Bermejo Rodriguez A, Ruiz Giardin JM, Garcia Martinez J, San Martin Lopez JV, Castaneda de la Mata A, Lopez Lacomba D, et al. Diagnostic model of visceral leishmaniasis based on bone marrow findings. Study of patients with clinical suspicion in which the parasite is not observed. *European Journal of Internal Medicine* [Internet]. 2019 Aug [cited 2019 Sep 5]; Available from: [https://www.ejinme.com/article/S0953-6205\(19\)30305-X/fulltext](https://www.ejinme.com/article/S0953-6205(19)30305-X/fulltext)

10.1.2. Otros artículos

2. Juan Victor San Martin, José M. Ruiz, Laura Molina, Luis Horrillo, Belén Matía, Alicia Castro, Elena Madroñal, Jesús García-Martínez, Ana Barrios, Noemí Cabello, Isabel G. Arata, Juan Hinojosa, Eduardo Canalejo, Jerónimo Jaqueti y Alfredo Bermejo. Capítulo “Leishmaniasis visceral en el municipio de Fuenlabrada” en Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: el papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid, Dirección General de Salud Pública; 2017: 135-137 <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017962.pdf>
3. Bermejo Rodriguez A, Molina Esteban LM. Hemofagocitosis en paciente con leishmaniasis visceral. *Laboratory Medicine at a glance*. 2015 Dec;1(1):1–3. <https://www.labmedglance.es/index.php/es/item/hemofagocitosis-en-paciente-con-leishmaniasis-visceral>
4. Freitas-Martinez A, Córdoba S, Bermejo A, Borbujo J. Mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* var *Lombardi* in an immunocompetent patient, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015 Sep;33(7):499–500. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mucocutaneous-leishmaniasis-caused-by-Leishmania-S0213005X14003942>

10.1.3. Comunicaciones a Congresos

1. Alfredo Bermejo, Adela Castaneda, Jesus Garcia, Daniel Lopez, Juan Victor San Martin, Santiago Prieto Menchero. Bone marrow aspirate features in visceral leishmaniasis patients: a study of leishmaniasis outbreak in Fuenlabrada (Spain). *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013 May; 35 (Suppl. 1): 100. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ijlh.12105>

2. E.M.Alvarez Santás, A.Bermejo Rodríguez, O.Leyva Peña, S.Prieto Menchero, A.Castañeda De La Mata, M.Y.Lecaros Avilés, J.García Martínez, E.Nieto Borrajo. Alteraciones analíticas en pacientes con Leishmaniasis visceral: estudio de un brote. Libro de Comunicaciones del 8 Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Octubre 2014: 124.
http://labclin2014.pacifico-meetings.com/images/site/Libro_labclin2014.pdf

3. Bermejo Rodríguez A., Castañeda de la M.A., López Lacomba D.,Ruiz Giardín J.M., García Martínez J. Características morfológicas del aspirado medular en pacientes con leishmaniasis visceral. Estudio de los casos del brote de leishmanias en Fuenlabrada. Ponencias y Comunicaciones SEHH 2014. Noviembre 2014: 669-670.
<https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2014/congreso/L-COMUNICACIONES-Y-PONENCIAS-SEHH-SETH-MAD-2014.pdf>

10.2. Documentos éticos: autorización del Comité ético



Hospital Universitario
de Fuenlabrada



Comité Ético de Investigación Clínica

Camino del Molino, 2
28942 FUENLABRADA – MADRID (ESPAÑA)

APR 16/09

D. Guillermo Plaza Mayor, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Fuenlabrada.

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado el Estudio titulado: **“Alteraciones Hematológicas en pacientes con Leishmaniasis Visceral: Análisis del brote detectado en Fuenlabrada entre 2009 y 2014.”**

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta dicho Estudio, y como Investigador Principal:

Dr. Alfredo Bermejo Rodríguez
del Servicio de **Hematología y Hemoterapia**
del **Hospital Universitario de Fuenlabrada**

Fuenlabrada, 28 de octubre de 2016

Firmado: D. Guillermo Plaza Mayor
Presidente del CEIC

10.3. Abreviaturas de uso habitual

ADE: ancho de distribución eritrocitaria.

ALT: alanina aminotransferasa

AST: aspartato aminotransferasa.

CLIA: ensayo quimioluminiscente indirecto.

CMV: citomegalovirus.

CRP: Proteína C reactiva.

Curva COR o ROC: curva de Característica Operativa del Receptor.

DAT: test de aglutinación directa.

ADN o DNA: ácido desoxirribonucleico.

ELISA: ensayo ligado a enzimas por inmunoabsorción.

FDA: Food and Drug Administration (administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos).

GGT: Gamma-glutamyltransferasa.

HLH: linfocitosis hemofagocítica.

iIFAT: test indirecto de anticuerpos inmunofluorescentes.

IL: Interleucina.

IFN: Interferon.

IgG, IgM e IgA: Inmunoglobulinas G, M y A.

LDH: Lactato dehidrogenasa.

LV: Leishmaniasis visceral.

MO: médula ósea.

NNN: medio de cultivo Novy-MacNel-Nicolle

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RDT: test o prueba de diagnóstico rápido.

SMD: síndrome mielodisplásico.

TGF: factor de crecimiento transformante.

TNF: factor de necrosis tumoral.

VCM: volumen corpuscular medio

VEB: virus de Epstein Barr.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VSG: velocidad de sedimentación globular.



***Alteraciones en médula ósea, sangre y bioquímica
sérica en pacientes con Leishmaniasis visceral***

Alfredo Bermejo Rodríguez