



---

Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL:

**ESTUDIO DE LA EXPOSICIÓN A  
LEISHMANIA EN AREAS DE  
ADIESTRAMIENTO Y EN OPERACIONES  
INTERNACIONALES DE LAS FUERZAS  
ARMADAS ESPAÑOLAS.**

Presentada por Juan José Ayuso Sainz para  
optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:  
Emiliano José Quinto Fernández  
Antonio Orduña Domingo  
María Isabel Jiménez Alonso

# Índice

---

ÍNDICE.....	1
ACRÓNIMOS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
<b>Historia</b> .....	<b>8</b>
<b>Genero <i>Leishmania</i></b> .....	<b>10</b>
<b>Genero <i>Phlebotomus</i></b> .....	<b>13</b>
<b>Leishmaniosis humanas</b> .....	<b>15</b>
Viejo Mundo .....	15
Nuevo Mundo.....	17
<b>La leishmaniosis animal</b> .....	<b>19</b>
Leishmaniosis canina .....	19
<b>Reservorios</b> .....	<b>21</b>
<b>Epidemiología</b> .....	<b>22</b>
<b>Patología</b> .....	<b>27</b>
Patogenia .....	28
<b>Tratamiento</b> .....	<b>30</b>
<b>Prevención y control</b> .....	<b>31</b>
<b>Vacunas</b> .....	<b>32</b>
<b>Control</b> .....	<b>34</b>
Control de vectores .....	34
Control de reservorios .....	36
<b>La leishmaniosis y el clima</b> .....	<b>39</b>
<b>Leishmaniosis y entorno socioeconómico</b> .....	<b>41</b>
<b>La leishmaniosis en España</b> .....	<b>42</b>
<b>Leishmaniosis y las Fuerzas Armadas</b> .....	<b>45</b>
Participación española en misiones internacionales .....	47
Otras operaciones .....	49
Datos de zonas de despliegue relacionadas con el riesgo de leishmaniosis. ....	50
Antigua Yugoslavia. ....	50
Líbano .....	52
Kuwait. ....	55
Irak. ....	56
Afganistán. ....	59

Medidas preventivas adoptadas por los contingentes.....	62
Programa de vigilancia.....	62
Plan de control de vectores .....	63
Plan de control de reservorios.....	64
Establecimiento del programa de educación para la salud del personal desplazado .....	65
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>69</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>70</b>
<b>DETECCIÓN DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (QPCR) EN CONEJOS SALVAJES .....</b>	<b>71</b>
Introducción .....	71
Material y Métodos .....	73
Animales .....	73
Muestras.....	74
Extracción del ADN y los análisis de qPCR.....	74
Resultados y Discusión .....	75
<b>DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>LEISHMANIA</i> EN FLEBOTOMOS.....</b>	<b>81</b>
Introducción .....	81
Métodos .....	83
Área geográfica .....	83
Captura e identificación de flebotomos.....	85
Extracción de ADN y análisis de PCR.....	87
Resultados y Discusión. ....	88
<b>DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>LEISHMANIA</i> EN SOLDADOS DESPLAZADOS EN MISIONES INTERNACIONALES. ....</b>	<b>95</b>
Introducción .....	95
Material y Métodos .....	97
Soldados.....	97
Climatología .....	97
Muestras .....	99
Extracción del DNA y análisis qPCR de las muestras de pelo .....	99
Inmunoensayo quimioluminiscente de las muestras de suero .....	100
Resultados y Discusión .....	101
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>109</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>129</b>

# Acrónimos

---

<b>ADN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>ADNk</b>	<b>ADN del kinetoplasto</b>
<b>CD4+</b>	<b>linfocitos T colaboradores</b>
<b>CDC</b>	<b>Centers for Disease Control and Prevention</b>
<b>CVBD</b>	<b>Companion Vector-Borne Diseases</b>
<b>CTM</b>	<b>Campo de Tiro y Maniobras</b>
<b>cPCR</b>	<b>PCR convencional</b>
<b>DEET</b>	<b>N,N-Dietil-meta-toluamida</b>
<b>EDO</b>	<b>Enfermedad de declaración obligatoria</b>
<b>ECDC</b>	<b>European Centre for Disease Prevention and Control</b>
<b>EEUU</b>	<b>Estados Unidos</b>
<b>EMA</b>	<b>Agencia Europea del Medicamento</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas</b>
<b>EUFOR RCA</b>	<b>Fuerza Europea en la República Centroafricana</b>
<b>EUMAM RCA</b>	<b>Misión de la Unión Europea en la República Centroafricana</b>
<b>ETV</b>	<b>Enfermedad de transmisión Vectorial</b>
<b>EUTM</b>	<b>European Union Trainig Mision</b>
<b>FINUL</b>	<b>Fuerza Interina de Naciones Unidas en el Líbano</b>
<b>ITS1</b>	<b>Región transcrita interna de gen ribosomal 1</b>
<b>ITS2</b>	<b>Región transcrita interna de gen ribosomal 2</b>
<b>IFI</b>	<b>Inmunofluorescencia indirecta</b>
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	<b>Interferón gamma</b>
<b>Ig</b>	<b>Inmunoglobulina</b>
<b>IL</b>	<b>Interleuquina</b>
<b>KFOR</b>	<b>Fuerza Internacional de Seguridad para Kosovo</b>
<b>LC</b>	<b>Leishmaniosis cutánea</b>
<b>LCan</b>	<b>Leishmaniosis canina</b>
<b>LMC</b>	<b>Leishmaniosis mucocutánea</b>
<b>LV</b>	<b>Leishmaniosis visceral</b>
<b>MFO</b>	<b>Fuerza Multinacional y Observadores</b>
<b>MLEE</b>	<b>Electroforesis enzimática multilocus</b>



<b><i>m s.n.m.</i></b>	<b><i>Metros sobre el nivel del mar</i></b>
<b><i>NK</i></b>	<b><i>Células citotóxicas naturales</i></b>
<b><i>OMS</i></b>	<b><i>Organización Mundial de la Salud</i></b>
<b><i>ONGs</i></b>	<b><i>Organizaciones no gubernamentales</i></b>
<b><i>OTAN/NATO</i></b>	<b><i>Organización del Tratado del Atlántico Norte</i></b>
<b><i>PCB</i></b>	<b><i>PolyChlorinated Biphenyls</i></b>
<b><i>PCR</i></b>	<b><i>Reacción en cadena de la polimerasa</i></b>
<b><i>PKDL</i></b>	<b><i>Leishmaniosis Diseminada post Kala Azar</i></b>
<b><i>qPCR</i></b>	<b><i>PCR a tiempo real o cuantitativa</i></b>
<b><i>RENAVE</i></b>	<b><i>Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica</i></b>
<b><i>SAO</i></b>	<b><i>Operación Tormenta del Desierto</i></b>
<b><i>Sb5+</i></b>	<b><i>Antimonio pentavalente</i></b>
<b><i>SMF</i></b>	<b><i>Sistema mononuclear fagocítico</i></b>
<b><i>TI</i></b>	<b><i>Tasa de Incidencia</i></b>
<b><i>Th1</i></b>	<b><i>Linfocitos T de tipo 1</i></b>
<b><i>Th2</i></b>	<b><i>Linfocitos T de tipo 2</i></b>
<b><i>ULV</i></b>	<b><i>Ultra Bajo Volumen</i></b>
<b><i>UNAVEM</i></b>	<b><i>Misión de Verificación de Naciones Unidas en Angola</i></b>
<b><i>UV</i></b>	<b><i>Ultravioleta</i></b>
<b><i>VIH</i></b>	<b><i>Virus de inmunodeficiencia humana</i></b>



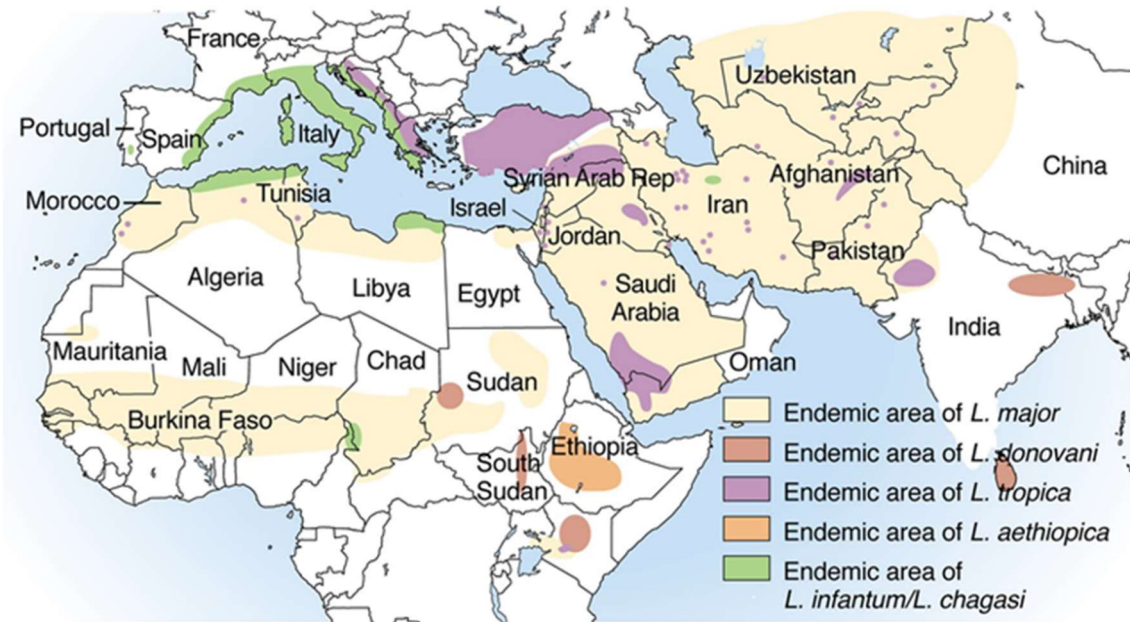
donde tiene lugar la metacicloogénesis. Los amastigotes se transforman en la forma infectiva, promastigotes metacíclicos, después de transformaciones y multiplicaciones. Los promastigotes metacíclicos se sitúan en la parte anterior del tubo digestivo (válvula estomodeal) y son inoculados cuando la hembra del flebotomo se alimenta de sangre de un vertebrado. Se han demostrado vías de transmisión secundarias tanto en humanos como en perros, incluida la transmisión congénita (Figueiró-Filho, Duarte, El-Beitune, Quintana, & Maia, 2004), la transmisión por transfusión de sangre (De Freitas, Melo, Da Costa-Val, & Michalick, 2006), así como, con carácter puntual, la transmisión mecánica entre consumidores de drogas (Desjeux & Alvar, 2003).



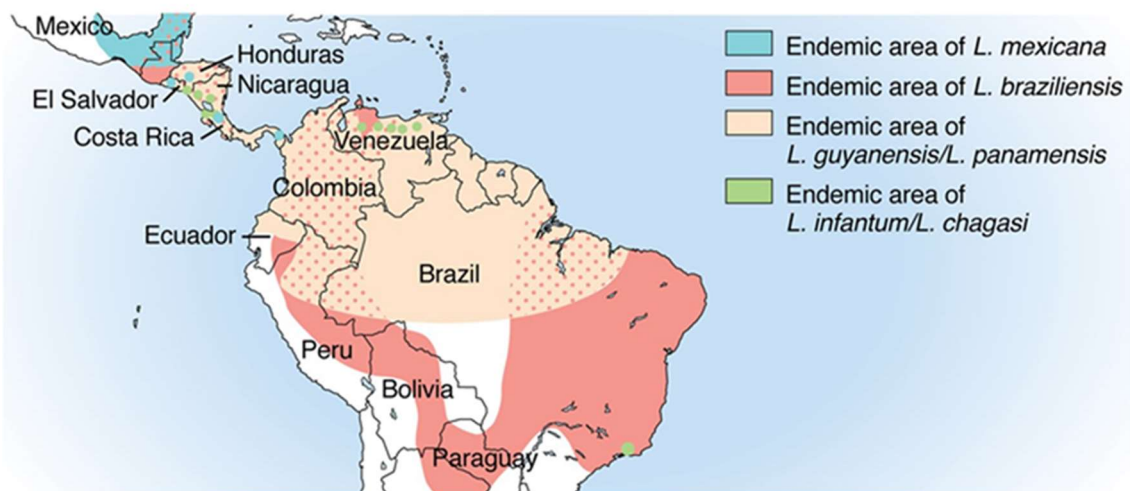
Mapa 2. Distribución geográfica de la leishmaniosis visceral. NW. Modificado de (Aronson et al., 2017).

Hay tres formas principales de la enfermedad en humanos: leishmaniosis cutánea (LC; infección primaria y más común), leishmaniosis mucocutánea (LMC; evolución de la forma cutánea sin resolver que afecta a las mucosas de nariz, boca y garganta) y leishmaniosis visceral (LV; kala-azar). La mayoría de las especies tiende a causar la enfermedad subclínica, y la gravedad de la infección depende de la especie y cepa de protozoo, de la respuesta inmune del huésped, de su estado nutricional y, en menor medida, de las especies de flebotomos (INE Carlos III, 2018). Se distinguen dos formas clínicas principales, la LC y la LV, dependiendo de qué tipo de células fagocíticas sean invadidas. En la LC (Mapas 3 y 4), los parásitos infectan a los macrófagos de la piel. Sin embargo, en la LV los amastigotes liberados se propagan por la circulación sanguínea e infectan las células del sistema de fagocitos mononucleares del hígado, el bazo, la médula ósea, los ganglios linfáticos. Las presentaciones clínicas pueden variar desde lesiones cutáneas localizadas en el caso de la LC, hasta enfermedad generalizada, con fiebre,

pérdida de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, leucopenia y trombocitopenia en la LV. Las distintas manifestaciones clínicas y la diversidad en su evolución y gravedad hacen de la leishmaniosis una de las enfermedades parasitarias más versátiles (OMS | Leishmaniosis, 2017; OMS, 2010).



Mapa 3. Distribución geográfica de la leishmaniosis cutánea. OW. Modificado de (Aronson et al., 2017).



Mapa 4. Distribución geográfica de la leishmaniosis cutánea. NW. Modificado de (Aronson et al., 2017).

Desde el año 1991 hasta el día de hoy se han llevado a cabo una serie de operaciones militares en Oriente Medio que han supuesto el despliegue de varios cientos de miles de soldados procedentes de casi cincuenta nacionalidades, entre ellos un grupo muy numeroso de soldados españoles. Estas operaciones han tenido lugar fundamentalmente en territorio de Afganistán e Iraq, aunque en el transcurso de éstas se

han establecido bases y campamentos en casi todos los países limítrofes del Golfo Pérsico, Península Arábiga, y repúblicas exsoviéticas de Asia Central y Paquistán, entre otras. Así mismo se han realizado despliegues en el Líbano, Bosnia i Herzegovina, Kosovo, Paquistán, Haití, Indonesia, República Centro Africana, Mali y otros. Todas estas regiones tienen en común ser áreas endémicas en *Leishmania*.

## Historia

La LC del Viejo Mundo es una enfermedad antigua y conocida como “úlceras orientales”. Hay descripciones de las lesiones visibles en tablillas en la biblioteca del Rey Ashurbanipal del siglo VII a. C., que derivan según se cree de textos anteriores de 1500 al 2500 a. C. (Steverding, 2017)

La LV del Viejo Mundo, o Kala Azar (literalmente 'la enfermedad negra' que se refiere a la decoloración grisácea de la piel de las personas en el curso de la infección), se advirtió por primera vez en la aldea de Mahomedpore, al este de Jessore en la Baja Bengala, India, en 1824. El parásito fue descubierto por Sir William Boog Leishman (1865–1926) (Ilustración 1) y Sir Charles Donovan (1863–1951) (Ilustración 2); a partir de entonces se estableció *L. donovani* como el componente esencial de la verdadera naturaleza de la enfermedad (Steverding, 2017).



Illustration 1. Tte. General Sir William Boog Leishman. (National Portrait Gallery, London)

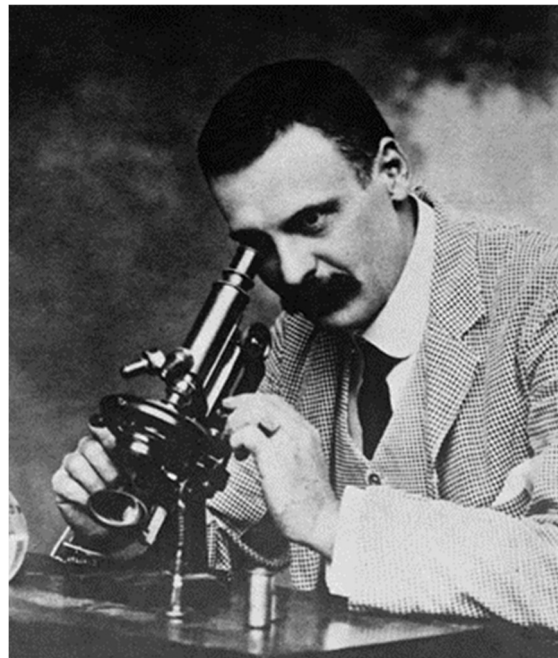


Ilustración 2. Tte. Coronel, Sir Charles Donovan. (<https://wellcomeimages.org/indexplus/image/V0026304.html>)



Merece la pena subrayar la relevancia del descubrimiento, en 1877, de Patrick Manson (1844 a 1922) al relacionar los vectores con la transmisión de parásitos (Cox, 2002).

En el Nuevo Mundo, las LC y LMC provocan afecciones desfigurantes ya representadas en la cerámica precolombina desde el siglo V (desierto de San Pedro de Atacama), evidenciando su presencia a gran altitud (2400 m s.n.m.). Misioneros y conquistadores españoles en el siglo XVI describen aspectos faciales coincidentes con LMC. Balthasar Ramírez, en su libro "Descripción del Reyno del Perú" (1580), emite los primeros informes de la enfermedad en América del Sur donde la denominada "Mal de los Andes". (Steverding, 2017).

Originalmente se pensó que la leishmaniosis del Nuevo Mundo y la leishmaniosis del Viejo Mundo eran lo mismo, pero en 1911 Gaspar de Oliveira Vianna (1885 –1914) (Ilustración 4) descubrió que los parásitos en América del Sur diferían de los de África. Tras el descubrimiento de la transmisión por flebotomos de la leishmaniosis del Viejo Mundo, también se supuso que los vectores del Nuevo Mundo pertenecían al género *Phlebotomus*, pero en 1922 se descubrió que el género involucrado era en realidad *Lutzomyia*.

El gobierno británico en la India ordenó, en 1898, a Ronald Ross (Ilustración 3) investigar el Kala-Azar; en 1903 publicó un artículo comentando que los cuerpos ovoides encontrados por Leishman y Donovan no eran tripanosomas degenerados, sino un organismo protozario nuevo. Ross sugirió nombrarlo *Leishmania donovani*, la especie causante de la LV (Steverding, 2017).



Ilustración 3. Tte. Col. Sir Ronal Ross. (Wellcome Library, London/Wikimedia Commons).

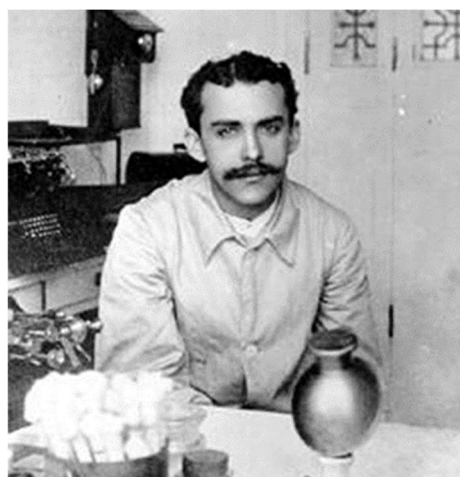


Ilustración 4. Gaspar de Oliveira Vianna.(Biblioteca Virtual Carlos Chagas).

En 1908, Charles Jules Henry Nicolle (1866–1936) describió *L. infantum* en niños de Túnez. En el mismo año, junto a Charles Comte (1869–1943), aisló el parásito en perros. Desde entonces, los perros son reconocidos como importantes reservorios de la LV.

Aunque se sospechaba desde un principio que los flebotomos eran los vectores de transmisión de los parásitos, no se demostró, hasta 1921, por Edmond Sergent (1876–1969) y Étienne Sergent (1878-1948) ; (Desjeux, 2004; Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel, & Gradoni, 2013b; Naqqash, Gökçe, Bakhsh, & Salim, 2016; OMS | Enfermedades transmitidas por vectores, 2017a; Reithinger et al., 2007a; Rodgers, Popper, & Wirth, 1990).

## Genero *Leishmania*

Los parásitos del género *Leishmania* causan una diversidad de síndromes. La distinción entre especies es fundamental para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Todas las especies incluidas en el género *Leishmania* presentan una morfología similar y, hasta hace unos años, la diferenciación en unidades específicas se basaba en la patogenicidad que producían y en su distribución geográfica.

La electroforesis enzimática multilocus (MLEE) ha sido la técnica de referencia para la identificación de especies de *Leishmania* y en la actualidad se utiliza el genotipado por amplificación de las regiones transcritas internas de los genes ribosomales ITS1e ITS2 (Akhoundi, Votýpka, & Kuhls, 2017). Las leishmanias se caracterizan por una enorme diversidad y las especies descritas presentan una enorme pluralidad. Por ejemplo, *L. braziliensis* presenta frecuentes polimorfismos enzimáticos intraespecíficos, sin embargo, *L. naiffi* o *L. guyanensis* son marcadamente homogéneas (Schönian, Mauricio, & Cupolillo, 2010).

El género *Leishmania* se compone de los subgéneros *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania*. Este último se limita a los reptiles. La diferencia fundamental entre ellos es la localización en la que se lleva a cabo la maduración de las formas infectantes en el interior del vector (Lainson, 1987).

Las cepas de referencia actualmente reconocidas ascienden a 29. El Código de identificación (código OMS) de las citadas cepas de referencia se corresponde con la siguiente información: HOSPEDADOR (del que se aisló la cepa) /PAIS (en el que se

adquirió la infección) /AÑO (en el que se efectuó el aislamiento) /LABORATORIO. Así por ejemplo para *L. infantum* BCN-150 sería: MHON/ES/1996/BCN-150 (Rioux et al., 1990). Hoy en día, se conocen 29 especies y aproximadamente 20 son patógenos para los seres humanos (OMS, 2010) (Tabla 1).

<b>Especie</b>	<b>Código internacional</b>
<i>L. (L.) aethiopica</i>	MHOM/ET/72/L 100
<i>L. (L.) amazonensis</i>	MHOM/BR/73/M2269
<i>L. (L.) arabicab</i>	MPSA/SA/83/J1SH220
<i>L. (L.) aristidesib</i>	MORY/PA/69/GML3
<i>L. (L.) donovani</i>	MHOM/IN/80/DD8
<i>L. (L.) garnhami</i>	MHOM/VE/76/JAP78
<i>L. (L.) gerbillib</i>	MRHO/CN/60/GERBILLI
<i>L. (L.) infantum chagasi</i>	MHOM/BR/74/M2682
<i>L. (L.) infantum</i>	MHOM/TN/80/IPT1
<i>L. (L.) killicki</i>	MHOM/TN/86/LEM904
<i>L. (L.) major</i>	MHOM/SU/73/5-ASKH
<i>L. (L.) mexicana</i>	MHOM/BZ/82/BEL21
<i>L. (L.) pifanoi</i>	MHOM/VE/57/LL1
<i>L. (L.) tropica</i>	MHOM/SU/74/K27
<i>L. (L.) forattinil</i>	MDID/BR/77/Conchas
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	MHOM/VE/00/H17
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/00/LTB300
<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/79/M2904
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/GF/79/LEM85
<i>L. (V.) lainsoni</i>	MHOM/BR/81/M6426
<i>L. (V.) lindenbergi</i>	MHOM/BR/96/15733
<i>L. (V.) panamensis</i>	MHOM/PA/71/LS94
<i>L. (V.) peruviana</i>	MHOM/PE/84/LC39
<i>L. (V.) utingensisb</i>	ITUB/BR/77/M4694
<i>L. colombiensis</i>	IHAR/CO/85/CL500
<i>L. deaneib</i>	MCOE/BR/74/M2674
<i>L. enriettiib</i>	MCAV/BR/45/L88
<i>L. equatoriensisb</i>	MCHO/EC/82/Lspl
<i>L. hertigib</i>	MCOE/PA/65/C8

Tabla 1. *Cepas de referencia de Leishmania. Modificada de (OMS, 2010).*



Las especies de *Leishmania* que afectan al ser humano son 18. (Tabla 2).

<b>Subgénero</b>	<b>L. (<i>Leishmania</i>)</b>	<b>L. (<i>Leishmania</i>)</b>	<b>L. (<i>Viannia</i>)</b>	<b>L. (<i>Viannia</i>)</b>
<b>Tropismo principal</b>	<b>Visceral</b>	<b>Dérmico</b>	<b>Dérmico</b>	<b>Mucoso.</b>
<b>Viejo Mundo</b>	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
<b>Nuevo Mundo</b>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. infantum</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. pifanoi</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. garnhami</i>	<i>L. lainsoni</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis</i>	

Tabla 2. *Leishmanias* encontradas en el ser humano. Modificado de (OMS, 2010)

Estas especies presentan diferentes características epidemiológicas y clínicas, además de particularidades relacionadas con diferentes perfiles genéticos y fenotípicos; sin embargo, su clasificación sigue siendo objeto de ciertas controversias (Bañuls et al., 2007).

*Sauroleishmania* se considera un subgénero ancestro del género *Leishmania*, aunque el análisis molecular revela la estrecha relación entre estas especies y las que infectan a los mamíferos. Este subgénero contiene una especie de cierta importancia: *L. tarentolae*. Se han llevado a cabo estudios experimentales en mamíferos inoculados con formas de promastigote para observar la posible aparición de enfermedad, pero el parásito no se desarrolló como ocurre con otras especies de *Leishmania* (Novo, Leles, Bianucci, & Araujo, 2016). Sin embargo, recientemente se ha publicado la detección mediante técnicas moleculares de *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* en sangre humana, siendo un contacto hospedador-parásito completamente inesperado (Pombi et al., 2020), también se ha identificado la presencia de sangre humana, de conejo y de otras especies en *Sergentomyia minuta* (González et al., 2020).

En este abanico de especies puede estar el origen de la clínica de la parasitosis, ya que se trata de un mosaico de formas a las que, además, en los últimos años, se han ido incorporando variantes como consecuencia de los cambios epidemiológicos en los ciclos de transmisión (Murray, Berman, Davies, & Saravia, 2005), así como circunstancias adicionales derivadas de la aparición de otras enfermedades infecciosas que producen cuadros de inmunodepresión, en los que parásitos de bajo perfil patógeno dan lugar a cuadros de los más heterogéneo.

## Genero Phlebotomus

La taxonomía de *Phlebotomina* (*Diptera*, *Psychodidae*, *Phlebotominae*) tiene enorme importancia debido al papel que estos tienen como vectores de varios patógenos, no solo las especies de *Leishmania*, sino también de *Bartonella* (como *Bartonella baciliformis* causante de la fiebre Oronga o enfermedad de Carrión) y diferentes flebovirus (“fiebre vírica de las moscas de arena”) (Ready, 2013), entre ellos virus Toscana (Remoli et al., 2016).

La denominación como “mosca de arena” es un nombre inapropiado llevando a confusión porque en algunas partes del mundo los mosquitos (género *Culicoides*) o moscas negras (familia *Simulidae*) también se conocen como moscas de arena. Los flebotomos se encuentran principalmente en los trópicos y subtropicos entre las latitudes 50° Norte y 40° Sur (Sharma & Singh, 2008). No están presentes en Nueva Zelanda ni en las islas del Pacífico. Están presentes en un amplio rango de hábitats, desde el nivel del mar hasta altitudes superiores a los 2800 m (los Andes y áreas montañosas de Etiopía) o cerca de los 3000 m (montañas de Afganistán) (Yared et al., 2017). Así mismo, con respecto al clima, están presentes desde los secos y cálidos desiertos, las sabanas y campo abierto, hasta los densos y lluviosos bosques tropicales (Alvar, Vélez, Bern, Herrero, Desjeux, Cano, Jannin, & de Boer, 2012).

La clasificación de los flebotomos está inicialmente basada en los caracteres morfológicos. Son dípteros y, por tanto, presentan metamorfosis completa. A lo largo de su ciclo de vida cuentan con 4 estadios morfológicamente distintos. El adulto de los flebotomos, a diferencia de otros dípteros, es de pequeño tamaño y con una estructura muy frágil. Son características sus alas dispuestas hacia el exterior y hacia arriba formando un ángulo de unos 60° con respecto a la elongación del abdomen, estas alas se muestran intensamente pobladas de pequeños pelillos (Ilustración 5), característica que

junto con su color gris oscuro y aspecto polvoriento son muy definitorias. Los ojos son relativamente grandes y las piezas bucales casi tan grandes como la propia cabeza; cuentan con largas antenas y palpos largos. Se distinguen de otras subfamilias de psicódidos por la ausencia de un puente de ojo y la presencia de palpos maxilares con cinco segmentos (partes bucales picadoras tan largas como la cabeza) (Killick-Kendrick, 1990; Killick-Kendrick et al., 1985; Lawyer & Perkins, 2000; Lawyer & Young, 1991; Lewis, 1982b; Young & Duncan, 1994).



*Ilustración 5. Hembra de Phlebotomo (CDC).*

El canal alimentario se extiende desde las piezas bucales hasta el cibario (espacio anterior a la verdadera cavidad bucal en la que el alimento es masticado. Esta cámara tiene largos músculos y dos series de dientes; los dientes anteriores o verticales se proyectan hacia abajo en la cavidad y aparecen como una serie de puntos cuando se ven ventrodorsalmente en muestras montadas en portaobjetos. Por su parte, los dientes posteriores u horizontales se proyectan hacia atrás, hacia la faringe. El número, tamaño y disposición de los dientes cibarianos son de considerable importancia taxonómica (Lane, 1993).

Hay aproximadamente 1.000 especies de flebotomos han sido descritas en todo el mundo, de las cuales más de la mitad están presentes en América (Young & Duncan,

1994). La barrera atlántica se ha considerado tradicionalmente como la principal causa de diferenciación entre los flebotomos del “Viejo Mundo” (regiones Paleártica, Afrotropical, Oriental y Australasia) y del “Nuevo Mundo” (Regiones Neoártica y Neotropical) (Lewis, 1982). Aunque no hay un acuerdo global sobre la clasificación de los flebotomos, las especies del Viejo Mundo plantean menos controversias y está generalmente aceptada la sistematización, no estando tan clara para las especies del Nuevo Mundo. Durante muchos años sólo se reconocieron 3 géneros en el Viejo Mundo: *Phlebotomus*, *Sargentomyia* y *Chinius*. Respecto a los flebotomos neotropicales, la mayoría de los investigadores adoptan las clasificaciones de Lewis (1982b) y las revisiones de Young y Duncan (1994), que reconocen 13 géneros, 15 subgéneros y 11 grupos de especies. Sin embargo, este sistema no muestra las relaciones evolutivas entre las especies, que es de gran interés en el género *Lutzomyia* (Shimabukuro, De Andrade, & Galati, 2017). Las revisiones más recientes y exhaustivas clasifican las 464 especies de flebotomos neotropicales en 22 géneros, 20 subgéneros, 3 grupos de especies y 28 especies (Shimabukuro et al., 2017). Esta clasificación representa un avance importante pero no está plenamente aceptada y se esperan nuevos cambios. Muchas de las hembras de una parte importante de las especies de América Latina están por describir.

*Sergentomyia* es el género dominante en los trópicos del Viejo Mundo, de África, India y Australia. Los miembros de este género se alimentan principalmente de reptiles y anfibios, aunque algunos pueden hacerlo de mamíferos incluso del hombre. Este género no contiene vectores conocidos (Maia & Depaquit, 2016)

*Lutzomyia* es el género más importante en el Nuevo Mundo. *Lutzomyia* se alimenta tanto de mamíferos como de aves (gallinas). Los miembros de este género se caracterizan por una hilera transversal de dientes posteriores y una o más hileras de dientes anteriores en el cibario de las hembras (Young & Duncan, 1994).

## Leishmaniosis humanas

### Viejo Mundo

La LV del Viejo Mundo, causada fundamentalmente por el complejo *L. donovani-L. infantum*, con algunos casos de *L. tropica*, presentan una mayoría de infecciones asintomáticas pero cuyas presentaciones han visto variaciones debido a los casos de coinfecciones VIH (Desjeux & Alvar, 2003) y la asociación a la malnutrición (OMS,

2017b). La forma endémica, cuya responsable fundamental es *L. infantum*, presenta una mayoría de casos en niños, y multitud de casos en adultos europeos coinfectados con VIH. En la India y África también se presenta en adultos jóvenes, en mayor grado en varones, y con un periodo de incubación que va desde los 10 días hasta más de un año. La sintomatología es inespecífica con esplenomegalia indolora, linfadenopatías (más frecuentes en África), oscurecimiento de la piel (más frecuente en la India; Kala Azar). La forma esporádica se presenta en no indígenas a cualquier edad con casos agudos en torno a las tres semanas posinfección y hasta los dos años, pero con un progreso rápido. Aparecen picos de fiebre con sudoración profusa y profundo malestar; en ocasiones se observan complicaciones como anemia hemolítica, lesiones renales y hemorragias mucosas. La forma epidémica antroponóticas también se presenta a cualquier edad en no inmunes y puede presentar formas agudas con gran mortalidad, tiene gran relevancia entre los coinfectados VIH (OMS, 2010).

La LC del Viejo Mundo presenta formas muy variables entre las diferentes regiones e incluso con grandes variaciones interregionales según: la especie de parásito, el tipo de ciclo, estado inmunitario del paciente y variables de tipo genético. La lesión clásica en el punto de inoculación aparece a lo largo de una semana de progresión, curando a lo largo de años dejando una depresión y despigmentación. En el Mediterráneo, las lesiones cutáneas por *L. infantum* son nódulos únicos con escasa inflamación que curan de forma espontánea a lo largo de un año. La LC por *L. tropica* es la cutánea antroponótica o antroponótica urbana con úlceras secas e indoloras pero múltiples que deja cicatrices desfigurantes después de desaparecer espontáneamente tras un año. La leishmaniosis lupoides o tuberculoide aparece como una forma crónica de la antroponótica urbana; las lesiones pueden progresar y durar varios años con una cicatriz con progresión periférica destructiva y desfigurante. El diagnóstico en ocasiones no se confirma hasta tardíamente debido a la escasez de amastigotes en las lesiones. La LC zoonótica o zoonótica rural producida por *L. major* produce lesiones que pueden ser múltiples en los individuos no inmunes, lesiones inflamadas y ulceradas que curan entre los dos y los ocho meses dejando grandes cicatrices. Finalmente, *L. aethiopica* produce una leishmaniosis con lesiones nodulares localizadas de evolución lenta, sin ulceración o con ulceración tardía, a veces en la región oronasal, con cura espontáneamente entre los dos y los cinco años. La LC difusa causada por *L. aethiopica*, forma pápulas, nódulos y placas cutáneas muy diseminadas con infiltraciones difusas, engrosamiento de las cejas y de los lóbulos

de las orejas, dando un aspecto similar al de la lepra. No cura espontáneamente y hay recidivas frecuentes tras el tratamiento. En inmunodeprimidos y coinfectados con VIH este cuadro también puede aparecer con otras especies de *Leishmania* como agente etiológico (“Leishmaniosis,” n.d.; Murray et al., 2005).

La leishmaniosis mucosa del Viejo Mundo es rara y puede ser causada por cualquier especie. En ocasiones, aparece en India o Sudán en pacientes con LV o PKDL o coinfectados con VIH. En estos casos, las lesiones laríngeas se cronifican (Al-Salem, Herricks, & Hotez, 2016; Monge-Maillo, Norman, Cruz, Alvar, & López-Vélez, 2014)

### Nuevo Mundo

En el Nuevo Mundo, la LV puede ser también endémica o esporádica, igualmente producida por *L. infantum* y siendo muy similar a la del Viejo Mundo. La mayoría de los casos se producen en menores de diez años, aunque también puede verse en los adultos. La PKDL es rara y lo más frecuente son las infecciones asintomáticas y las formas leves. La malnutrición, factores genéticos, otras infecciones y el VIH son factores importantes en su difusión.

La LC del Nuevo Mundo exhibe una amplia gama de formas clínicas y múltiples especies de *Leishmania*. Son procesos cutáneos o mucocutáneos con lesiones que pueden ser localizadas o diseminadas, difusas y atípicas. En las localizadas, las lesiones pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo iniciándose, generalmente, en el punto de inoculación; a partir de ese momento se extienden y forman una lesión crateriforme. Aparecen semanas, meses o años después de la infección. Mientras que los pacientes de *L. mexicana* curan entre los tres o cuatro meses, los de *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guayanensis* y *L. peruviana* pueden curarse a partir de los seis meses. En las infecciones de *L. braziliensis* y *L. panamensis* pueden darse casos de infecciones secundarias y enfermedad mucosa. La leishmaniosis cutánea por *L. infantum* suele ser atípica, principalmente en Centroamérica y afecta a niños mayores y a adultos jóvenes.

La LMC, denominación aplicada exclusivamente al Nuevo Mundo, es producida por el subgénero *Viannia* y las especies de *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Se extiende por Bolivia, Brasil y Perú. Aparecen lesiones metastásicas en la mucosa de la boca y de las vías respiratorias altas, que pueden presentarse desde meses hasta veinte años después de la lesión cutánea. Afecta a adultos jóvenes, fundamentalmente a varones con

malnutrición e inmunodeprimidos. Las lesiones primarias suelen aparecer por encima de la cintura, grandes y múltiples y con retardo en la curación. Las lesiones nasales siempre están presentes y otros lugares de aparición según su frecuencia son la laringe, paladar, faringe, tráquea y labio superior. En las fases finales aparecen graves mutilaciones y casi nunca cura de forma espontánea. Las infecciones secundarias son frecuentes y suelen conducir a la muerte por una neumonía intercurrente.

La LC difusa del Nuevo Mundo es similar a la del Viejo Mundo: no se observan lesiones mucosas y tampoco cura de forma espontánea, siendo frecuentes las recidivas. Esta forma sólo se asocia a las especies de *L. mexicana* y *L. amazonensis*.

La LC diseminada presenta numerosas lesiones nodulares o úlceras extensas producidas por las especies de *Leishmania braziliensis*, *panamensis*, *guayanensis* y *amazonensis*; pueden observarse desde veinte hasta cientos de lesiones cutáneas.

La PKDL aparece en todas las zonas donde *L. donovani* es endémica, con más frecuencia en África Oriental y en la India. Se observa entre el 10 y el 50% de los pacientes con Kala-Azar. Aparece entre los seis meses y el año tras la aparente curación de la LV y, a veces, al mismo tiempo. Se observan máculas pigmentadas que pueden volverse papulares o nodulares especialmente en la cara, aunque también pueden verse en la mucosa bucal, genital o conjuntival. Cura espontáneamente en algunos casos en África, pero nunca en la India. Los brotes observados en Sudán han permitido establecer la siguiente graduación: grado 1, erupción maculo-papular o nodular dispersa en la cara; grado 2, erupción maculo-papular o nodular densa; y grado 3, erupción maculo-papular o nodular densa en casi todo el cuerpo afectando al labio y al paladar (Zijlstra & Jorge Alvar, 2012).

Los casos de coinfección con VIH merecen una mención especial (Al-Salem et al., 2016; Desjeux & Alvar, 2003). Tienen más probabilidad de sufrir la forma visceral que va a mermar su capacidad de respuesta a los retrovirales. En los pacientes que presenten inmunodeficiencia severa, la enfermedad va a presentar localizaciones atípicas como el tubo digestivo, el peritoneo, el pulmón y el espacio pleural, y en muchos casos afecciones esofágicas que cursan con disfagia y onicofagia. En el Nuevo Mundo, los enfermos de SIDA con leishmaniosis tegumentaria simultánea presentan lesiones múltiples, polimorfas y recidivantes, formas difusas y PKDL asociada a LV.

En 2018 se notificaron en Europa más de 200 casos importados, principalmente de África y América. Los viajeros presentaron LC (generalmente adquirida en áreas específicas como Sudamérica). La LV es menos frecuente (adquirida en destinos turísticos del sur de Europa como España, Italia, Grecia y Turquía) y se considera de especial riesgo para inmunodeprimidos. La forma LMC es rara. En inmigrantes, la LC es también la forma más frecuente (Norman, Chamorro, Comeche, Pérez-Molina, & López-Vélez, 2020). (Mapas 1 y 2).

## La leishmaniosis animal

Aunque la infección natural en roedores y cánidos es más común (Alvar, Vélez, Bern, Herrero, Desjeux, Cano, Jannin, & de Boer, 2012), el parásito puede infectar liebres, marsupiales, quirópteros, lagomorfos, prociónidos, felinos, perosidáctilos y primates. Los cánidos, los roedores y el hombre son las principales especies afectadas, aunque la infección se ha descrito en muchos otros animales, incluidos gatos, ovejas, cabras y caballos (“Leishmaniosis,” n.d.; Serra, Gállego, Ramis, Fondevila, & Ferrer, 2003). En los países del sur de Europa, la leishmaniosis es causada por *L. infantum*, donde los perros y el hombre son los huéspedes más afectados.

### Leishmaniosis canina

La LCan es causada por *L. infantum* (sin. *L. chagasi*, en América). Los perros infectados constituyen el principal reservorio doméstico del parásito y juegan un papel clave en la transmisión a los humanos. Lobos, zorros y chacales son portadores del parásito y constituyen el ciclo salvaje (Javier Millán, Ferroglio, & Solano-Gallego, 2014). Sólo el zorro, gracias a su sinantropía con los humanos, establece la relación entre el ciclo salvaje y el ciclo doméstico (Pennisi, 2015; Miró, et al, 2008; Saridomichelakis & Koutinas, 2014).

*L. infantum* se transmite sólo por la picadura de flebotomos (Coutinho & Linardi, 2007; Zanatta Coutinho et al., 2005). La existencia de parásitos en el semen y la orina sugiere una nueva posibilidad (Turchetti, Souza, Paixão, & Santos, 2014). En alguna ocasión, sin embargo, se ha podido constatar la transmisión de la enfermedad de forma iatrogénica por transfusión sanguínea (De Freitas et al., 2006).

Los perros asintomáticos, con parásitos en la piel, son los auténticos portadores. En general, la capacidad de los perros sintomáticos y asintomáticos para infectar



flebotomos es muy alta (Alvar et al., 2004; Molina et al., 1994), lo que tiene un impacto epidemiológico muy grande (Solano-Gallego et al., 2011). Por otro lado, factores como el estado de nutrición, la virulencia de la cepa del parásito, la capacidad vectorial de las especies de flebotomos y cepas implicadas en la transmisión, etc., pueden desempeñar un papel en la intensidad de transmisión en un foco específico (Killick-Kendrick, 1990).

Entre los factores que determinan si la enfermedad progresa después de la infección, el estado nutricional es crítico debido a su efecto directo sobre el estado inmunológico del hospedador (Saridomichelakis, 2009). Los factores genéticos también contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Moreno & Alvar, 2002).

La mayoría de los perros infectados presentan los síntomas característicos de la enfermedad. En la mayoría de los casos los órganos del perro se ven afectados y las úlceras y los parches de calvicie están muy extendidos, exhiben caquexia y la muerte es el resultado de insuficiencia renal o hepática, además de presentarse infecciones oportunistas (Molina et al., 1994; Tavares Veras, Moth Fraga, Silva Solc, & Sampaio Guedes, 2014).

El control de la LCan tiene como objetivo reducir el número de casos de LV humana disminuyendo la prevalencia en perros. En general, las estrategias se basan en el diagnóstico precoz y tratamiento de perros infectados, cribado inmunológico y sacrificio de perros seropositivos y, adicionalmente, utilización de los insecticidas dirigidos al control de los flebotomos. Las medidas de control de infecciones deben estar enfocadas principalmente a prevenir el contacto con el insecto vector, ya sea a través de barreras físicas (mallas finas en ventanas y perreras), barreras químicas (repelentes), o manipulación (evitar la exposición al crepúsculo, eliminando material orgánico peridomiciliar) (Ribeiro et al., 2018). La vacunación contra LCan es una herramienta reciente, pero desafortunadamente, las dos vacunas comerciales disponibles tienen una moderada eficacia protectora (Ribeiro et al., 2018; Velez et al., 2020). No hay evidencia científica de que el sacrificio de perros seropositivos pueda reducir la incidencia de leishmaniosis. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda sacrificar perros infectados con *L. infantum*, pero al mismo tiempo reconoce la dificultad de llevar a cabo esta medida en países muy sensibles con los animales (Desjeux, 2004). Por tanto, la vacunación frente a la leishmaniosis, asociada con insecticidas tópicos, es sin duda la forma más eficaz de prevención y control de la LCan (González et al., 2015).

## Reservorios

El reservorio se define como el sistema ecológico en el que un agente infeccioso vive persistentemente. La mayoría de las leishmaniosis son zoonosis y los reservorios son mamíferos distintos del hombre. El hombre simplemente actúa como un huésped accidental (Ashford, 1997).

Las condiciones requeridas para el mantenimiento de todas las especies de *Leishmania* son, en general, similares, por lo que algunas especies de mamíferos son reservorio para más de una especie de *Leishmania*. En la actualidad se sabe que un pequeño número de especies de mamíferos actúan como reservorios, aunque muchas otras especies se infectan e incluso pueden presentar lesiones.

Entre los reservorios domésticos y peridomésticos, el perro ocupa un lugar especial con respecto a *L. infantum*, aunque también puede ser infectado por otras especies de *Leishmania* con carácter accidental (*L. tropica*, *L. major* y *L. braziliensis*). La gran cantidad de brotes de leishmaniosis canina sin casos humanos explica la gran distribución tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. Por otro lado, la gran versatilidad de *L. infantum* le permite ser vehiculada por gran número de especies de flebotomos. Los perros infectados, aún asintomáticos (aproximadamente un 50%), son muy infecciosos para los vectores (Laurenti et al., 2013; Souza, Turchetti, Fujiwara, Paixão, & Santos, 2014).

Con respecto a los cánidos salvajes que actúan como reservorios, en el Viejo Mundo destacan el zorro, el chacal, y el lobo, infectados por *L. infantum* (Alvar et al., 2004; Javier Millán et al., 2014).

*Rhombomys opimus* (el jerbo grande) participa en el ciclo de *L. major* en Asia Central, pero no todas las leishmanias de este reservorio son infectivas para el ser humano. El gran jerbo de las estepas de Irán, el norte de Afganistán, Uzbekistán y Tayikistán aún muchas de las características de un reservorio ideal para la leishmaniosis. La especie es gregaria, viviendo en densas colonias que ocupan extensos sistemas de madrigueras que proporcionan temperatura y desechos orgánicos adecuados para muchos ocupantes, incluidos los flebotomos. El gran jerbo es el reservorio de *L. major* y tiene dos especies propias, *L. turanica* y *L. gerbilli*. Todos causan síntomas similares consistentes en lesiones cutáneas en zonas con menos pelo como la cabeza, las orejas o la base del

rabo. En algunas ocasiones los parásitos se visceralizan. La infección humana proviene de vivir cerca de colonias de *R. opimus*. En las comunidades humanas asentadas, este puede ser un problema menor que afecta solo a los niños pequeños, que luego son inmunes antes de que la desfiguración se vuelva importante. Sólo los casos graves o las infecciones en personas mayores son graves (Burza, Croft, & Boelaert, 2018).

*Psammomys obesus* (rata gorda de arena o jird gordo) también es reservorio de *L. major* en Asia Occidental y África septentrional. Los arbustos quenopodiáceos halófilos juegan un importante papel en el ciclo epidemiológico pues limitan su hábitat. Este roedor se distribuye a través del semidesierto en la franja norte del Sahara desde Mauritania a Egipto, así como Israel, Palestina, Jordania, Arabia Saudita y Siria. *P. obesus* es el principal reservorio de *L. major* y la fuente de epidemias de leishmaniosis en dicha zona. Este roedor también puede verse infectado por *L. arabica*, aunque no se sabe que produzca enfermedades en humanos.

Las poblaciones de hyrax o damanes (mamíferos herbívoros del orden *Hyrcoidea*) son reservorios de *L. aethiopica* en África oriental, *L. inominata* en Namibia y *L. tropica* en Israel y Arabia Saudí (Millán et al., 2011; Roque & Jansen, 2014).

Además de los reservorios reconocidos, *Otolymys phyllotis* (rata trepadora orejuda) y *Neofoma micropus* (un roedor), son reservorios de *L. mexicana*. Los reservorios naturales de *L. amazonensis* incluyen marsupiales, edentates (mamíferos sudamericanos sin dientes) y otros carnívoros y roedores. (Urbà González et al., 2015)

## Epidemiología

La distribución de todas las especies de *Leishmania* que infectan a los humanos, sus vectores y reservorios son ampliamente conocidas (Ashford, 1996; Killick-Kendrick, 1999; OMS, 2010; Ready, 2013).

La transmisión de *Leishmania* es ciclopropagativa e implica interacciones entre el parásito, el vector y un hospedador vertebrado sensible. (Ashford, 1997)

El contacto vector-hospedador depende de una combinación de factores. Para el flebotomo se trata de preferencias de hábitat, comportamiento de agregación, distribución horizontal y vertical, distribución estacional y comportamiento alimentario. Para el hospedador vertebrado, incluidos los humanos, estos factores son la exposición (hábitat),

los ciclos de actividad, el comportamiento defensivo, y el tipo y ubicación del nido (Lane, 1993)

Para que un vector competente transmita parásitos infecciosos a un hospedador susceptible, debe haber al menos alguna superposición temporal en sus respectivos hábitats de modo que el vector tenga la oportunidad de alimentarse del huésped. Esta situación se representa perfectamente en los ciclos enzoóticos que implican sólo un huésped reservorio, como en el caso de la LV enzoótica causada por *L. chagasi* en la región amazónica de Brasil. Estos escenarios también se producen en la LV antroponótica causada por *L. donovani* en Kenia, Sudán, India y Nepal, así como en la LC antroponótica causada por *L. tropica* en algunas ciudades y pueblos del Medio Oriente donde los seres humanos son el único o principal reservorio y fuente de infección (“Leishmaniosis,” n.d.; P. Ready, 2014).

La transmisión de *L. major* por *P. papatasi* en la cuenca mediterránea y Asia meridional y central, y por *P. duboscqi* en el África subsahariana, representan ciclos zoonóticos en los que los seres humanos son huéspedes accidentales o secundarios. Los seres humanos se infectan accidentalmente cuando sus viviendas y actividades invaden los del vector y el reservorio primario (Aklilu et al., 2017). La LC causada por *L. major* en la costa norte del Mar Muerto implica la presencia de dos hospedadores: *Psammomys obesus*, cuyas colonias se ubican lejos de las aldeas y no facilitan la llegada del vector, así como *P. papatasi* hasta el ser humano como segundo hospedador (Salam, Al-Shaqha, & Azzi, 2014).

Aunque la LV se conoce en 74 países, el 90 % de los casos aparecen en seis de ellos: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil (OMS | Leishmaniosis, 2017). La LV es causada principalmente por *L. infantum* y *L. donovani*, pero otras especies como *L. tropica* y *L. amazonensis* también pueden invadir las vísceras. La enfermedad causada por *L. infantum* es una zoonosis, mientras que la causada por *L. donovani* es una zoonosis en África oriental y una antroponosis en el continente indio (OMS, 2010).

La LV está muy extendida en África Oriental con varios focos en Etiopía, Kenia, Somalia, Sudán del Sur, Sudán y Uganda. Fuera de esta subregión, se han notificado casos esporádicos en Chad, Níger, Burkina Faso y Gambia. Provoca brotes frecuentes en las áreas de sabana y bosques donde los mosquitos viven alrededor de los montículos de

termitas y en las grietas del suelo. La LC aparece en África occidental y oriental (P. G. Lawyer & Perkins, 2000).

La LV es la enfermedad de los más pobres entre los pobres, principalmente en el subcontinente indio y África oriental. La pobreza, que incluye viviendas deficientes y malas condiciones sanitarias, ayuda a aumentar la población de vectores y su contacto con los seres humanos (Oryan & Akbari, 2016).

La transmisión de *Leishmania* está influenciada por factores meteorológicos y de comportamiento que conducen a una epidemiología compleja. La topografía y la cobertura vegetal son indicadores de riesgo muy importantes. El contacto entre humanos y flebotomos aumenta en aldeas situadas en colinas rocosas y a orillas de ríos en África oriental, en las áreas de transmisión de *L. aethiopica* (Reithinger, 2016), así como en las casas situadas en la periferia de una aldea cerca del bosque en el caso de *L. guyanensis* en América. Tanto los machos como las hembras de flebotomos adultos necesitan carbohidratos para obtener energía y prolongar su longevidad (Killick-Kendrick, 1999; Lewis & Domoney, 1966). Además de los azúcares, requieren de una o más ingestas de sangre para cada lote de huevos puestos en las ovoposiciones. La intensidad lumínica, la temperatura ambiente, humedad relativa, movimiento del aire y otras condiciones físicas adecuadas estimulan a las hembras a buscar fuentes de sangre (Williams, 1970; Young & Lawyer, 1987). Así, un mínimo movimiento del aire junto con otras condiciones óptimas puede aumentar la actividad de picar: en algunos focos, las tasas de picadura pueden ser >1.000/h, pero <1/h en otros. Las velocidades del viento > 1.5 m / seg. inhiben el vuelo, y cesa completamente en vientos > 4-5 m / seg. (Lane, 1993). La mayoría de las especies de flebotomos vuelan horizontalmente cerca del nivel del suelo, aunque algunas que habitan el bosque también se mueven verticalmente entre el suelo del bosque y el dosel raramente más de 200 de su lugar de descanso (Alexander, 1987; Ready, 2013; Tesh et al., 1974). En los hábitats de sabana y semidesierto típicos del Viejo Mundo, los rangos de vuelo pueden ser más largos. La mayoría de las especies antropofílicas se alimentan al anochecer y durante la noche, cuando las temperaturas bajan y la humedad relativa aumenta (Fraihy et al., 2017; Killick-Kendrick, Wilkes, Bailly, Bailly, & Righton, 1986; Marayati et al., 2015; Schlein et al., 1990).

En Europa, la LV causada por *L. infantum* aparece en la región mediterránea. Los perros son los principales reservorios del parásito, pero también se han encontrado otros

animales como zorros (*Vulpes vulpes*), ratas negras (*Rattus rattus*), liebres (*Lepus europaeus* y *Lepus granatensis*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*) (Maia & Campino, 2011; Pennisi, 2015). En esta región la LV está restringida principalmente a los niños; sin embargo, los adultos VIH positivos llegan a ser el 50% del total de pacientes infectados. *L. infantum*, además de causar LV, también ha sido relacionada como agente de LC en varios países alrededor del Mar Mediterráneo, así como en Kirguistán y Mauritania. Debido a los viajes de perros y humanos, y a la reubicación de perros del sur a Europa central, la enfermedad tiene el potencial de propagarse a áreas templadas del norte, principalmente Austria, Suiza y Alemania (Mansueto, Seidita, Vitale, & Cascio, 2014). Generalmente, los parásitos se transmiten por *P. ariasi* y *P. perniciosus* en Francia, éstos dos más *P. perfiliewi* y *P. neglectus* en Italia, y algunos otros también se han sospechado como vectores en otros países (Ready, 2010). La LV causada por *L. infantum* está ampliamente distribuida en Asia Central y China, y varias especies del género *Phlebotomus* se consideran vectores (Board, 2001).

En Oriente Medio, desde Turquía hasta Afganistán, la LV y la LC pueden ser causadas por varias especies de *Leishmania* ayudadas por muchos vectores y reservorios de *L. infantum* (perros y roedores). *L. tropica* y *L. infantum*, principalmente, han sido aisladas de pacientes humanos con LV, la última siendo aislada de hámsteres salvajes (*Cricetus cricetus*) junto con *L. donovani* (Jacobson, 2011).

En América, se producen más de 5000 casos de LV al año (Alvar, Vélez, Bern, Herrero, Desjeux, Cano, Jannin, & de Boer, 2012), de los cuales el 96 % se detecta en Brasil; también se está extendiendo al norte de Argentina y Paraguay, Colombia, Venezuela y algunos países centroamericanos. *Lutzomyia longipalpis* es el vector primario en la mayoría de los focos de LV. Sin embargo, otras especies como *Lu. cruzi* (en Brasil), *Pifanomyia evansi* (en Colombia) y *Migonemyia migonei* (en Argentina y Brasil) también pueden estar involucradas en algunos focos, principalmente en áreas sin *Lu. longipalpis*. Los perros son los reservorios más importantes y a veces se han encontrado infectados perros salvajes y zarigüeyas (Roque & Jansen, 2014).

La LV causada por *L. donovani* se distribuye por el noreste de la India, Bangladesh, Bután y Nepal, donde *P. argentipes*, asociado principalmente al ganado, es el vector principal. También se han encontrado casos de LV y/o LC atribuidos a *L. donovani* en algunos países de Oriente Medio (Israel, Irak, Arabia Saudita, Yemen), en

China y en Europa (Ucrania) (OMS, 2010). En el este de África, *L. donovani* está ampliamente distribuida. La enfermedad en Sudán es transmitida principalmente por *Ph. orientalis* en las áreas con predominio de bosques de acacias, mientras que *P. martini* es el vector en la sabana con montículos de termitas (Ready, 2013). Aunque los perros son muy atractivos para *P. orientalis* y pueden infectarse con *L. donovani*, no se consideran reservorios importantes de este parásito (Alvar et al., 2004).

La pandemia del VIH influyó en la aparición de leishmaniosis, en particular de la LV (Desjeux & Alvar, 2003). En Europa, fueron los VIH positivos que viven en zonas rurales los más expuestos a la infección y al desarrollo de la enfermedad. En Brasil, la difusión del VIH desde las grandes ciudades a las más pequeñas y a las zonas rurales se acompañó de la difusión de la leishmaniosis (Rabello, Orsini, & Disch, 2013). También se ha detectado, en el sudoeste de Europa, la transmisión de *Leishmania* a través de la transfusión de sangre en humanos y entre los consumidores de drogas intravenosas (Desjeux & Alvar, 2003).

Se ha sospechado del papel de las garrapatas (*Ixodoidea*) y pulgas (*Siphonaptera*) como posibles vectores de *L. infantum*, principalmente en áreas con ausencia de los flebótomos (Coutinho & Linardi, 2007). *L. infantum* puede permanecer viable en otros artrópodos, aunque no hay pruebas de que puedan actuar como vectores.

Se han publicado varios casos de transmisión congénita de *L. donovani* y *L. infantum* en humanos (Figueiró-Filho et al., 2004) y de *L. infantum* en perros en los EEUU (Grinnage-Pulley, Scott, & Petersen, 2016). Las lesiones en el tracto genital de perros machos positivos a la presencia de *L. infantum* indican la posibilidad de una transmisión venérea (Maia & Cardoso, 2015). La reciente constatación en Finlandia de tres casos autóctonos de LV en perros, probablemente infectados por contacto con un perro que acompañó a sus dueños en una visita a España, pone de relieve la posibilidad de transmisión directa del parásito y la necesidad de prestar atención a la posibilidad de la aparición de casos en zonas sin problemas de flebotomos (Maia & Cardoso, 2015).

La LC está ampliamente distribuida y en expansión en todos los continentes condicionada por las actividades humanas, como proyectos agrícolas, deforestación, migración y cambios climáticos. Es probable que existan nuevas especies que circulen entre los mamíferos silvestres y que terminen infectando a los humanos. *L. siamensis*, se ha asociado a la LV, la LC y la LC diseminada en humanos infectados por el VIH en

Tailandia, encontrándose una especie similar infectando caballos en Europa central (Müller et al., 2009).

*L. braziliensis*, transmitida por varias especies de flebotomos causa la mayoría de los casos de LC en el Nuevo Mundo. Los roedores se consideran reservorios importantes, pero se han encontrado zarigüeyas (*Didelphimorphia*) y otros mamíferos infectados. Los perros pueden estar infectados pero no parecen constituir buenos reservorios; también se han encontrado gatos y burros infectados (Maia & Campino, 2011; Pigott, Bhatt, Golding, Duda, Battle & Brady, 2014; Ready, 2014).

## Patología

Las infecciones y las enfermedades parasitarias son dos situaciones distintas originadas a partir de un mismo proceso. El parásito es una condición necesaria pero no suficiente para iniciar una enfermedad parasitaria. La enfermedad parasitaria resulta de la presencia de determinado parásito en determinado hospedador, en determinada población, en determinado ambiente, y a lo largo de un período de coevolución vital particular de ambos protagonistas.

Los primeros intentos de clasificar las formas clínicas de leishmaniosis datan de principios del siglo XX. Las diferentes formas clínicas en pacientes afectados por LC inducen a un diagnóstico erróneo. La clasificación histórica y clásica de la leishmaniosis es: visceral (Kala-azar) producida por la especie *L. donovani*, cutánea (el Botón de Oriente) producida por *L. tropica* y forma mucocutánea (cutánea) producida por *L. braziliensis*. Esta clasificación se hizo exclusivamente observando el comportamiento clínico y evolutivo de la enfermedad. Sin embargo, existe una estrecha relación entre la aparición de diferentes formas clínicas de la enfermedad y factores relacionados con la especie y cepas del parásito, hábitos del vector, factores relacionados con la respuesta inmune del huésped y con la interacción huésped-parásito (Davies et al., 2017).

Por tanto, la expresión de la leishmaniosis depende de una compleja interacción entre el tipo de especie infectante y la respuesta inmune del huésped. La interacción entre *Leishmania* y la respuesta del huésped humano se manifiesta no sólo por el desenlace clínico o subclínico de la enfermedad, sino también por las tasas de curación espontánea y de recurrencia (Eldridge & Edman, 2004).



## Patogenia

Las diversas manifestaciones clínicas de *Leishmania* son el resultado de la interacción entre el tipo de especie infectante y la respuesta inmune del huésped. Esta variabilidad hace que algunas especies estén más adaptadas para atacar la piel y otras para invadir órganos viscerales; en concreto, sigue sin conocerse perfectamente la causa de la afinidad del parásito por los macrófagos y sus receptores específicos.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniosis, si las hay, están influenciadas por la capacidad del huésped para desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz que, en gran medida, está determinada por factores genéticos y adquiridos.

Los neutrófilos son las primeras células que hacen frente a las leishmanias en el lugar de su inoculación por los flebotomos. Los linfocitos citotóxicos naturales NK (“natural killer”), influyen en el curso de la infección y de la enfermedad. La participación de los neutrófilos en la infección potencia la patogenia de algunas especies de *Leishmania* (como *L. major*), mientras que contribuyen a la protección frente a otras especies (como es el caso de *L. donovani* y *L. amazonensis*) (Burza et al., 2018).

Los modelos murinos de LC y LV han demostrado que las células CD4<sup>+</sup> T-helper 1 desempeñan un papel fundamental en el control de la infección a través de una interacción con las células presentadoras de antígenos expuestas a los protozoos de *Leishmania*, lo que da como resultado la liberación del interferón IFN- $\gamma$ ; éste, a su vez, estimula a los macrófagos activados para que produzcan óxido nítrico, lo que provoca la destrucción intracelular de los amastigotes de *Leishmania*. Su eficacia depende de la cantidad de óxido nítrico liberado y de la magnitud de los efectos supresores de la interleucina IL-10 producida por las células T reguladoras. Los polimorfismos en los genes implicados en dichas interacciones inmunitarias pueden desempeñar un papel en el pleiomorfismo clínico demostrado por la leishmaniosis (Alexander & Brombacher, 2012; Reed & Scott, 1993).

Las respuestas inmunitarias tanto excesivas como deficientes pueden conducir a presentaciones crónicas de la enfermedad. La inmunodepresión mediada por la infección durante la LV deja al huésped indefenso ante una carga masiva de parásitos, y el aumento de la hipersensibilidad mediada por células produce enfermedad cutánea y mucosa, crónica y desfigurante. Además, las condiciones inmunosupresoras adquiridas pueden

modular la expresión de la leishmaniosis. De hecho, los pacientes infectados por el VIH tienen una mayor susceptibilidad a la LV, incluso habiendo sido infectados por especies con afinidad cutánea. Además, en ocasiones su expresión carece de las manifestaciones clásicas y, a su vez, empeora la inmunosupresión crónica subyacente conduciendo a la progresión al SIDA (Al-Salem et al., 2016; Okwor & Uzonna, 2013).

En la LV se produce una hiperplasia reticuloendotelial tras la infección por *L. donovani* o *L. infantum* que afecta al bazo, hígado, mucosa del intestino delgado, médula ósea, ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides. La vida de los leucocitos y los eritrocitos se reduce, con la consiguiente granulocitopenia y anemia. La función hepática puede ser normal o encontrarse alterada. La parasitación intestinal y la ulceración o la enteritis secundaria pueden producir diarrea. En fases avanzadas son habituales las infecciones intercurrentes como neumonía, disentería y tuberculosis, siendo causas frecuentes de muerte. La relación entre infecciones asintomáticas y casos clínicos varía de 1:2,6 en Sudán a 50:1 en España, y está fuertemente influenciada por las especies de parásitos y la nutrición (Alvar, Yactayo, & Bern, 2006; “Leishmaniosis,” n.d.).

La PKDL es una complicación de la LV. Se desencadena por los propios mecanismos inmunitarios, apareciendo zonas aisladas con una reacción granulomatosa y escasos parásitos en las formas maculares, y considerable infiltración por histiocitos, edema, proliferación capilar y numerosos parásitos en las formas eritematosa y nodular (Zijlstra, 2016).

En la LC difusa aparece hipersensibilidad cutánea de tipo retardado mediada por células de carácter más débil que en la LC localizada. En la LC difusa hay ausencia de inmunidad celular y se caracteriza por una intensa infiltración dérmica por macrófagos (Reithinger et al., 2007b).

En la LMC hay lesiones histológicas similares a las observadas en la LC, es decir, predomina una reacción celular exudativa inespecífica. Se caracteriza por una intensa hipersensibilidad cutánea retardada.

Varios genes están implicados en la susceptibilidad a la enfermedad en la LV humana. Los estudios sobre kala-azar causada por *L. donovani* en áreas endémicas de Sudán (Mohamed et al., 2003) demostraron que existe una base genética compleja para la susceptibilidad a desarrollar LV en humanos. Esta base genérica involucra varios

mecanismos y genes adicionales relacionados con la interleucina IL-4 y el interferón IFN- $\gamma$  (Davies et al., 2017).

En los perros, la LCan se caracteriza por períodos de incubación generalmente largos (de 2 meses a años), una evolución sistémica debido a la infección de macrófagos en todos los tejidos y órganos, y alteraciones por una respuesta inmune exacerbada con una hiperproducción de anticuerpos y deposición de inmunocomplejos con uveítis, vasculitis y glomerulonefritis. La genética del hospedador desempeña un papel importante en la susceptibilidad o resistencia a la LCan (Mohamed et al., 2003; Rupert, Quinnell et al., 2003). Así, estudios epidemiológicos en poblaciones caninas de sabueso ibicenco sugirieron que la genérica juega un papel en la resistencia al desarrollo de la enfermedad (desarrolla una respuesta inmune principalmente celular y muy raramente desarrolla una enfermedad clínica) (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau, & Ferrer, 2008).

## Tratamiento

La enfermedad cutánea LC cura por reepitelización con cicatrización. En el Viejo Mundo, la mayoría de las lesiones autocuran en 2-4 meses (las causadas por *L. major*) o de 6 a 15 meses (las causadas por *L. tropica*). La LC por *L. major* autocura con rapidez. Se trata para acelerar la curación, reducir la cicatrización, especialmente en los sitios estéticos, y para intentar prevenir la diseminación o la recaída. En el caso de *L. tropica*, la infección no se cura rápidamente en solitario y puede ser difícil de tratar. El único tratamiento eficaz se consigue con los antimoniales pentavalentes intravenosos (Sb<sup>5+</sup>) (Murray et al., 2005).

En la LC del Nuevo Mundo, la autocuración es rápida después de 3 meses en el caso de *L. mexicana* (>75 %), pero lenta en infecciones por *L. braziliensis* (10 %) y *L. panamensis* (35 %). El tratamiento se realiza especialmente para evitar secuelas desfigurantes en lesiones mucosas (Reithinger et al., 2007b; Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo, Ruiz-Esmenjaud, & Arenas, 2017).

El tratamiento de la LMC se realiza con antimoniales durante 28 días, alcanzándose una tasa de curación de alrededor del 75% en pacientes con formas leves o moderadas (Murray et al., 2005).

Tanto en la LC como en la LMC, las manifestaciones físicas tardan en mejorar con cualquier tratamiento, pero el tamaño de las lesiones disminuye en al menos dos tercios a las 6 semanas. Los pacientes deben mantenerse en observación durante 6-12 meses para mostrar una curación completa y sin recaída.

En el tratamiento de la LV, el antimonio sigue siendo la piedra angular terapéutica en todas las regiones excepto en Bihar (India), que supone alrededor del 90 % de los casos de la India y alrededor del 45 % de los casos del mundo; y el sur de Europa. El antimonio es efectivo, pero tiene inconvenientes bien reconocidos: costo, larga duración y reacciones adversas. La pentamidina resultó ser un sustituto insatisfactorio del antimonio en la India. El desoxicolato de anfotericina B convencional es muy eficaz, especialmente responde bien el Kala Azar indio. El primer tratamiento oral eficaz para la LV es la miltefosina, incluso para la infección resistente al antimonio (Aronson et al., 2016).

La mayoría de los pacientes responden con mejoría clínica después de 7-10 días. Sin embargo, el 5-10 % no responde o muere durante el tratamiento debido a que la enfermedad está muy avanzada, a una enfermedad intercurrente o a la toxicidad por fármacos; entre el 5 y el 10% de los pacientes aparentemente curados recaen, produciéndose más a menudo dentro de los 6 meses posteriores al tratamiento (“Leishmaniosis,” n.d.).

## Prevención y control

Los enfoques para prevenir la enfermedad se centran en evitar la transmisión mediante el control de los vectores y la reducción del contacto humano con flebótomos infectados, así como, en el control de reservorios mediante la reducción del número de animales infectados. Aunque el mayor grado de atención se centra en la prevención de la LV por ser la principal causa de muerte por leishmaniosis, la LC también se tiene en cuenta (Murray et al., 2005).

Resulta prioritario establecer nuevas estrategias de prevención con la mejora de la educación sanitaria y el tratamiento y la gestión de los casos. La falta de acceso a medicamentos adecuados y el incumplimiento de los protocolos, merman la eficacia en la gestión de los casos facilitando la aparición de resistencias a los medicamentos.

El uso de insecticidas para reducir el número de flebótomos es esencial para reducir el número de casos de LC. Sin embargo, se plantea si es mejor usar insecticidas

para rociar las paredes internas de las casas o usar mosquiteras, sábanas o cortinas tratadas con insecticida (Crum et al., 2005), incluso mejorar la protección personal con ropa tratada con insecticida (Urbà González et al., 2015). Con respecto al control de los reservorios, también se ha ensayado el sacrificio de perros como medio para de reducir la LV (Courtenay et al., 2002).

Las decisiones de gestión sanitaria (programas de control) deben tener en cuenta la epidemiología y el comportamiento de los flebotomos locales, así como la diversidad de escenarios de transmisión (incluidos los reservorios vectoriales y animales o humanos). Así, como medidas importantes de control se cita: la erradicación del vector mediante insecticidas, la eliminación de aguas estancadas, el uso de repelentes de insectos, las medidas de profilaxis para evitar las picaduras (ropa gruesa de manga larga que se pueda impregnar con insecticidas, y pantalones largos) y también, evitar paseos nocturnos en zonas epidémicas (Reithinger, 2016).

## Vacunas

Se han depositado grandes esperanzas en el desarrollo de una vacuna para el ser humano basándose en que la recuperación de la infección se suele acompañar de una fuerte inmunidad, lo que se ha puesto de manifiesto en los animales de experimentación. Sin embargo, los mecanismos genéticos implicados en la inmunorregulación son más complejos en los seres humanos que en los ratones, y puede existir susceptibilidad genética a diferentes formas de leishmaniosis (“Leishmaniosis,” n.d.).

El principio fundamental de la inmunorregulación de la leishmaniosis es que el parásito, que se replica en los macrófagos inactivos, es destruido por los macrófagos activados (Von Stebut & Tenzer, 2018). Se están investigando varios tipos de vacunas: con parásitos enteros muertos o atenuados, péptidos sintéticos o recombinantes, y vectores de vacunas vivas recombinantes, con o sin citocinas u otros adyuvantes (Schroeder & Aebischer, 2011). También ha utilizado la leishmanización, o inoculación intradérmica intermitente de promastigotes virulentos de *L. major* procedentes de cultivos frescos, aunque este procedimiento puede producir lesiones cutáneas graves (Scott & Novais, 2016).

Las vacunas de primera generación contra la leishmaniosis se hicieron con extractos de parásitos o parásitos enteros muertos (Schroeder & Aebischer, 2011). Los

primeros intentos de desarrollar vacunas de este tipo contra la LC se han llevado a cabo en Brasil, Colombia, Ecuador, República Islámica de Irán y Venezuela, y contra la LV en Sudán (Gradoni, 2015; Mendonça, 2016). Se han probado tres vacunas: una basada en *L. amazonensis* en Brasil, otra con *L. mexicana* producida en Venezuela, y una tercera con *L. major* producida en la República Islámica de Irán (Gilchrist, 1999). Los resultados han sido negativos o no concluyentes con respecto a la profilaxis, pero alentadores en indicaciones terapéuticas (OMS, 2010).

Las vacunas de segunda generación consisten en vacunas genéticas o con proteínas recombinantes como la LEISH-F2, y podrían adoptarse para la prevención de la leishmaniosis humana. Recientemente, las vacunas vivas atenuadas y de ADN han inducido una respuesta inmunitaria adecuada contra las infecciones por *L. infantum* y *L. donovani* (Dantas-Torres et al., 2019; Moafi, Sherkat, Taleban, & Rezvan, 2019). Las ventajas que supone la capacidad de manipular el genoma de *Leishmania* al introducir o eliminar genes tiene el potencial de hacer que las vacunas vivas atenuadas sean mucho más factibles (Pandey, Kumar, & Samant, 2020).

Por lo que se refiere a las vacunas contra la leishmaniosis canina (LCan), debe inducir una inmunidad celular fuerte y duradera dominada por Th1, al tiempo que reduzca la carga de parásitos en los perros para disminuir su capacidad de transmisión a los flebotomos (Alvar et al., 2013). CaniLeish® (Virbac, Francia) es la primera vacuna LCan en obtener licencia en Europa, habiendo sido aprobada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en 2011. Es una vacuna de segunda generación compuesta de proteínas de *L. infantum*. Recientemente, la EMA ha autorizado la vacuna LetiFend® (Laboratorios Leti, España), teniendo como base la proteína Q, una proteína recombinante formada por la fusión de cinco fragmentos antigénicos de proteínas intracelulares de *L. infantum* (Oliva et al., 2014). Brasil se convirtió en el primer país del mundo en ofrecer vacunas comercialmente disponibles para inmunizar perros contra *L. infantum* (Carcelén et al., 2009). En 2003, el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento de Brasil (MAPA) autorizó la vacuna Leishmune® (Zoetis) que está compuesta de una fracción de GP63 de *L. donovani* que porta un ligando Fucosa–Manosa (FML) y como adyuvante QuilA (Quilloja saponaria). En 2014 el ministerio de Agricultura de Brasil decide retirar la producción de la vacuna y licencia por la falta de eficacia en ensayos de fase III. En 2007, el MAPA (Brasil) autorizó el uso de la vacuna Leish-Tec® (Hertape SA) que contiene una proteína recombinante de amastigotes, que actualmente es la única vacuna

comercial disponible contra LCan en Brasil (Fabrício Marçal do Nascimento, Dias de Moura, Luis Souza dos Santos, C Vallur, & do Socorro Pires e Cruz, 2021) (Tabla 3). Estas vacunas han reducido la gravedad de la enfermedad clínica en el perro, pero no han reducido las tasas de transmisión.

<i>Nombre comercial/con licencia</i>	<i>Antígenos/adyuvantes</i>
<i>CaniLeish®/Virbac</i>	Proteínas excretadas-secretadas de <i>L. infantum</i> (LiESP) / QA21
<i>Calibre Leish-Tech®/Hertape</i>	Proteína recombinante A2 de <i>L. donovani</i> /Saponina
<i>Leishmune®/Zoetis (temporalmente suspendida)</i>	Ligando Fucosa-Manosa (FML) de <i>L. donovani</i> /QS21
<i>LetiFend®/Leti + MSD-Salud Animal</i>	Proteína Q recombinante de <i>L. infantum</i> / Ninguna

Tabla 3. Vacunas frente a la LCan, vacunas comercializadas. Modificada de (Reguera, et al, 2016)

## Control

### Control de vectores

El objetivo de reducir la leishmaniosis humana en los programas de control consiste en interrumpir la transmisión de la enfermedad controlando los flebotomos vectores, principalmente en los hábitats de transmisión doméstica y peridoméstica. Entre los procedimientos de control tenemos la utilización de los productos químicos, la gestión del medio ambiente o la protección personal. Aunque algunos pueden tener un importante efecto, es recomendable que el control combine más de un método en una estrategia integrada de control de los vectores. Esos conjuntos de medidas dependen del buen conocimiento de la epidemiología local de la leishmaniosis (en particular si su transmisión es antroponótica o zoonótica) y de un conocimiento detallado de las especies de vectores implicadas, sus hábitats (peridomésticos o selváticos), radio de vuelo, reservorios preferidos para alimentarse, lugares de reposo, ritmos circadianos y estacionalidad. El control de las leishmaniosis se ha integrado a menudo con el de otras enfermedades transmitidas por vectores y combinan intervenciones y recursos para hacer frente a varias enfermedades (por ejemplo, el paludismo, el dengue o la filariasis) en una determinada zona (OMS, 2017c).

Los principales métodos para controlar los flebotomos con insecticidas son la fumigación de interiores con insecticidas de acción residual, la fumigación de los lugares

de reposo de las especies selváticas, la utilización de materiales impregnados con insecticidas (mosquiteros de cama y cortinas), y los collares para perros impregnados con piretroides.

En la actualidad, el control de los flebotomos depende principalmente de los piretroides. La única resistencia de los flebotomos a los insecticidas es al organoclorado DDT (diclorodifeniltricloroetano) en la India (Murray et al., 2005; OMS, 2017c). Es posible que se hayan desarrollado resistencias a los piretroides en zonas donde se hayan utilizado durante mucho tiempo, por lo que la rotación de insecticidas a intervalos apropiados es ineludible (Lobo, Achee, Greico, & Collins, 2018)

Las mosquiteras son esenciales en aquellas zonas en las que los flebotomos interiores son más activos; proporcionan una protección sustancial aunque sólo son completamente efectivas con malla estrecha; en el caso de malla ancha, la protección de la red se mejora con el tratamiento con piretroides (Davies et al., 2003). En la actualidad se están evaluando mosquiteras tratadas con insecticida de larga duración incorporado al material durante la fabricación (Coleman et al., 2011). Cuando la transmisión no está asociada exclusivamente con el interior de la vivienda, la ropa de cama o las cortinas de las ventanas tratadas con insecticida brindan protección contra la LC (Coleman et al., 2006; OMS | Enfermedades transmitidas por vectores, 2017b).

En el caso de la LCan, el uso de collares de perros impregnados con piretroides y otras formas de aplicación de los piretroides a los perros es crucial para el control de la LC y la LV zoonóticas (Ribeiro et al., 2018), reduciendo la incidencia de la LV infantil (Reithinger, 2016).

La gestión medioambiental sobre los nichos ecológicos reduce las poblaciones de flebotomos o su contacto con los humanos. El emplazamiento de los asentamientos humanos lejos de los hábitats de los flebotomos o las medidas como la modificación física de los hábitats (lugares de cría y reposo: escombreras y vertederos de basuras), la destrucción de las madrigueras de los reservorios o la deforestación de los asentamientos son eficaces para reducir o eliminar el contacto entre los vectores y el ser humano.

Antes de iniciar cualquier actividad de control de los flebotomos se necesita la monitorización entomológica y la evaluación de los vectores (Burkett, Knight, Dennett, Sherwood, Rowton, Coleman, et al., 2007). La evaluación de la efectividad de las



intervenciones sobre la transmisión debe incluir estudios con criterios epidemiológicos humanos o estudios sobre el efecto de las tasas de infección por flebotomos (Burkett, Knight, Dennett, Sherwood, Rowton, Coleman, et al., 2007).

### Control de reservorios

El control de los reservorios es esencial en las estrategias de control de las LV y LC zoonóticas. Las medidas a tomar en cada situación dependen de las condiciones particulares.

El ser humano es el único reservorio demostrado de infección por *L. donovani* en zonas endémicas de LV en Bangladesh, India septentrional y oriental, y Nepal, y un importante reservorio en Sudán y África Oriental (Alvar, Vélez, Bern, Herrero, Desjeux, Cano, Jannin, & de Boer, 2012). También se considera que *L. tropica* depende del ser humano para sobrevivir, al menos en los focos endémicos establecidos hace mucho tiempo. Los pacientes con PKDL pueden seguir presentando síntomas durante años en ausencia de enfermedad sistémica y de tratamiento, y probablemente constituyan el principal reservorio interepidémico (WHO, 2012). Los pacientes coinfectados por *Leishmania* y VIH son muy infecciosos para los flebotomos, aumentando la tasa de coinfección (Al-Salem et al., 2016; Desjeux & Alvar, 2003).

En lo que respecta a los reservorios caninos, el control es esencial y las medidas deben estar adaptadas a cada situación particular. La eliminación de los perros callejeros y asilvestrados se justifica por muchos motivos relacionados con la salud, el medio ambiente y la conservación, y simplemente la LV zoonótica es una justificación más. Antes de iniciar las actividades de control hay que determinar la distribución y la frecuencia de la infección en los perros. El cribado masivo de los perros domésticos suele hacerse con pruebas serológicas (ELISA, IFI) o biología molecular, efectuando al mismo tiempo un examen clínico de cada animal para detectar alteraciones patológicas teniendo en consideración el hecho de que solo menos de la mitad de los perros infectados presentan signos de enfermedad, y un elevado porcentaje de los perros asintomáticos infectados son infecciosos (Ribeiro et al., 2018). En una situación ideal, todos los perros sintomáticos o seropositivos deberían ser sacrificados; sin embargo, las pruebas con sacrificio masivo dentro de los programas de control no han demostrado ser eficaces (OMS, 2010; Romero & Boelaert, 2010).

En algunos países del área mediterránea la eutanasia de los perros domésticos infectados se reserva para casos especiales, como los farmacorresistentes, los repetidamente recidivantes, o en situaciones epidemiológicas peligrosas (Gradoni, López-Vélez, & Mokni, 2017). La mayoría de los veterinarios prefieren tratar la leishmaniosis canina y observar atentamente a los animales para detectar eventuales recidivas. Los medicamentos utilizados de forma primaria en la enfermedad humana no se deberían utilizar para tratar la leishmaniosis canina. La quimioterapia actual se basa en monoterapia o terapia combinada de fármacos leishmanicidas (principalmente formulaciones  $Sb5^+$ ) con el compuesto alopurinol. Esta combinación mejora considerablemente los signos clínicos derivados de la infección y reduce casi por completo la carga parasitaria. Sin embargo, el tratamiento es largo, tedioso y desagradable para perros y dueños. (Reguera et al., 2016). A pesar de la curación clínica, un porcentaje de perros tratados recuperó la capacidad de infectar flebótomos varios meses después de la quimioterapia, enmascarando así el problema epidemiológico del origen de la infección. Los veterinarios clínicos deben saber que son los principales actores en este escenario, para prevenir la transmisión del parásito a los humanos.

El uso de insecticidas tópicos como los collares impregnados en deltametrina, imidacloprid o formulaciones tópicas focales (spot-on) basadas en la permetrina o en fipronil, es eficaz frente a las picaduras de los flebótomos y reduce la incidencia de la CanL y la incidencia de la LV en el ser humano, dependiendo del nivel de endemicidad en la zona (Gaglio, Napoli, Falsone, Giannetto, & Brianti, 2017) (Tabla 4).

<i>Nombre comercial/con licencia</i>	<i>Compuestos farmacéuticos/solicitud Forma/duración</i>
<i>Scalibor®/MSD-Salud Animal</i>	4% deltametrina/collarín de PVC impregnado/4–6 meses
<i>Seresto®/Bayer Animal Health</i>	10% imidacloprid + 4,5% flumetrina/collarín de PVC impregnado/8 meses
<i>Advantix®/Bayer Animal Health</i>	10% imidacloprid + 50% permetrina/spot-on/3 semanas
<i>Exspot®/MSD-Salud animal</i>	65 % de permetrina/spot-on/2-3 semanas
<i>Frontect® o Frontline Tri-Act®/Merial</i>	6,76% fipronil + 50,48% permetrina/spot-on/3 semanas
<i>Effitix® o Fiprotix® o Fipratix®/Virbac</i>	6,1% fipronil + 54,5% permetrina/spot-on/4 semanas
<i>Perfikan®/Clément Thékan</i>	6,1% fipronil + 54,5% permetrina/spot-on/4 semanas

Tabla 4. Tipos y composición de dispositivos insecticidas tópicos para LCan. (Reguera et al., 2016)

Utilizando la base del enfoque One Health para la prevención de la infección por *Leishmania* zoonótica en animales y humanos, los miembros del CVBD (Companion Vector-Borne Diseases) World Forum (Baneth et al., 2012) abogan por las siguientes recomendaciones:

Sobre la **infección por *L. infantum* en los animales** de compañía:

*1. Los animales de compañía deben protegerse de las picaduras de flebotomos para prevenir la infección primaria por leishmania o la propagación de perros ya infectados. También se pueden usar medidas de control adicionales, incluido el control de vectores ambientales, vacunación y medicamentos profilácticos, cuando estén disponibles.*

*2. El sacrificio de perros en áreas donde la LV es endémica debe reemplazarse con medidas alternativas no terminales que puedan prevenir la infección en perros.*

Con respecto a la reducción del riesgo de **infección por *L. infantum* en perros y humanos**, se recomiendan las siguientes medidas:

*1. Promover la prevención de las picaduras de flebotomos para reducir el riesgo de infección por *L. infantum* en perros no infectados y su propagación de perros ya infectados.*

*2. Mejorar la salud general y el estado nutricional de los perros.*

*3. Implementar los conceptos más recientes sobre el manejo clínico de la leishmaniosis canina, incluidos los enfoques de diagnóstico y tratamiento.*

*4. Mejorar las condiciones ambientales y de alojamiento para mejorar el control de los flebotomos y reducir la exposición de los seres humanos a los vectores.*

En la lucha frente *Rhombomys opimus* (el gran jerbo) una estrategia consiste en destruir los sistemas de madrigueras arando con un arado de subsuelo y utilizando diversos anticoagulantes biocidas para su eliminación. La eliminación total solo es alcanzable donde se pueda evitar la reinvasión con barreras físicas. Las madrigueras de *Psammomys obesus* (la rata obesa del desierto) son fácilmente identificables por la vegetación halofítica que las rodea y también los anticoagulantes son eficaces para su

control. La destrucción de las quenopodiáceas silvestres debe extenderse a una distancia de 1–2 km de las viviendas. (OMS, 2010)

Los gerbillos o meriones (*Meriones spp.*) son difíciles de identificar morfológicamente o por el aspecto de sus madrigueras, pero se han desarrollado medidas de control con la utilización de los anticoagulantes, siendo eficaces. Es muy importante también la recogida periódica de la basura doméstica, el relleno de las fosas de basura y la destrucción mecánica de las madrigueras, seguidas del uso de la tierra.

La eliminación de los damanes en la periferia de los pueblos en un radio de 1 km de las instalaciones se considera eficaz y reduce la transmisión; dado que la reinvasión es probable, el control debe ser continuo.

En el Nuevo Mundo hay pocas medidas nacionales para controlar los reservorios, en particular los animales salvajes. Podría ser eficaz la gestión medioambiental que combinara la tala de la selva primaria alrededor de los poblados y la fumigación de las zonas para eliminar tanto los reservorios como el vector, creando así zonas libres alrededor de los pueblos (González et al., 2015).

## La leishmaniosis y el clima

Más del 80% de la población mundial está en riesgo de contraer una enfermedad transmitida por vectores, de las cuales las transmitidas por mosquitos son las más importantes. Se cree que muchos procesos globales, como el uso de la tierra y el cambio socioeconómico, afectan la dinámica de las enfermedades transmitidas por mosquitos. Hasta la fecha, la investigación se ha centrado en el papel del cambio climático. No hay consenso sobre cómo los cambios futuros en las condiciones climáticas afectarán a las enfermedades transmitidas por mosquitos (Franklinos, Jones, Redding, & Abubakar, 2019).

Además, la globalización y los viajes aéreos internacionales contribuyen a la dispersión internacional de patógenos y vectores (Mansueto et al., 2014). Sin embargo, el seguimiento de los pronósticos de las condiciones meteorológicas puede ayudar a detectar precursores epidémicos de brotes de enfermedades transmitidas por vectores y servir como sistemas de alerta temprana para la reducción de riesgos.

El cambio climático afecta predominantemente a las expansiones y contracciones del rango estacional de enfermedades transmitidas por vectores, particularmente en Europa (Semenza & Menne, 2009). El clima influye en el ciclo de vida de los vectores, así como en la tasa de reproducción de los parásitos dentro de los vectores y de los hospedadores humanos, lo que significa que los aumentos de temperatura pueden reducir el período de incubación de estos patógenos y el ciclo de vida de los vectores, lo que aumenta el riesgo de transmisión. Los cambios en las estaciones también pueden afectar a los animales vectores y huéspedes, la actividad humana y el uso de la tierra, lo que, en consecuencia, podría afectar aún más la distribución espacio-temporal y la prevalencia de las enfermedades transmitidas por vectores en Europa (Ready, 2010).

La temperatura, la precipitación, la humedad y otros factores climáticos afectan la reproducción, el desarrollo, el comportamiento y la dinámica de la población de los artrópodos vectores de estas enfermedades (Palatnik-de-Sousa & Day, 2011).

La predicción de los efectos del cambio climático sobre la leishmaniosis se complica por la presencia de reservorios vertebrados que también se verían afectados (Gage, Burkot, Eisen, & Hayes, 2008)

El cambio climático afectará a la distribución de la leishmaniosis de tres maneras: directamente, por el efecto de la temperatura sobre el desarrollo del parásito y la competencia del vector, e indirectamente, por el efecto de la temperatura y otras variables ambientales sobre el rango y abundancia de las especies de flebotomos que actúan como vectores y también indirectamente, a través de cambios socioeconómicos que afectan la cantidad de contacto humano con los ciclos de transmisión (Houweling et al., 2016).

En Europa, los flebotomos tienen una dispersión mayor que los parásitos (Ready, 2010a), como es el caso de su desplazamiento hacia el norte de Italia de los vectores flebotomos (Maroli et al. 2008). En Europa central, se prevé que el riesgo sea bajo debido a las restricciones de temperatura en la reproducción de patógenos (Fischer, Moeller, Thomas, Naucke, & Beierkuhnlein, 2011).

En algunas regiones del sur de Europa el cambio climático podría cambiar el rango de leishmaniosis en el futuro debido a que la temperatura y la humedad relativa afectan la tasa de supervivencia y reproducción de los flebotomos y el desarrollo del parásito (Semenza & Suk, 2018). Por otro lado, el riesgo de transmisión puede disminuir cuando

las condiciones climáticas se vuelven demasiado cálidas y secas para la supervivencia del vector.

Así, un estudio sugiere que el clima en Europa central será cada vez más hospitalario para *Phlebotomus* spp. (Fischer et al. 2011). Un segundo estudio predijo que, a fines de la década de 2060, el sur del Reino Unido, Francia, Alemania y el oeste de Polonia podrían estar poblados por flebotomos, predominantemente *P. ariasi* y *P. perniciosus*, mientras que la Península Balcánica, la Cuenca Mediterránea y la Cuenca de los Cárpatos podrían ser climáticamente hospitalarias para muchas especies de *Phlebotomus* (Trájer et al., 2013).

Se puede concluir que el cambio climático afectará a la extensión de la enfermedad y a la gravedad de los brotes (Alvar, Vélez, Bern, Herrero, Desjeux, Cano, Jannin, & de Boer, 2012).

## Leishmaniosis y entorno socioeconómico.

La leishmaniosis continúa representando un importante problema de salud pública en todo el mundo, pero afecta en mayor medida a las poblaciones más pobres del planeta, principalmente en aldeas remotas. Adicionalmente, está asociada a la malnutrición, a los desplazamientos de población, a las malas condiciones de las viviendas (suelos de tierra, paredes de barro resquebrajadas, etc.), a la debilidad del sistema inmunitario y a la falta de recursos (Al-Salem et al., 2016).

La leishmaniosis está clasificada como una de las enfermedades tropicales más desatendidas y, en comparación con otras enfermedades, el tratamiento es muy caro, lo que constituye un factor importante que contribuye a la pobreza de las personas afectadas.

La leishmaniosis está vinculada a los cambios ambientales como la deforestación, la construcción de presas, los sistemas de riego y la urbanización. En los países en desarrollo, la transmisión de la leishmaniosis fue favorecida por la tendencia a la formación de grandes aglomeraciones humanas de bajo nivel socioeconómico que viven en áreas periurbanas recientemente expandidas cerca de bosques o vegetación densa (Valero & Uriarte, 2020).

La pobreza también empeora el desenlace clínico de la leishmaniosis; la malnutrición y la anemia aumentan su gravedad. Las dietas bajas en proteínas, hierro,

vitamina A y zinc aumentan el riesgo de que la infección evolucione hasta su forma completa de LV (OMS, 2017a).

## La leishmaniosis en España

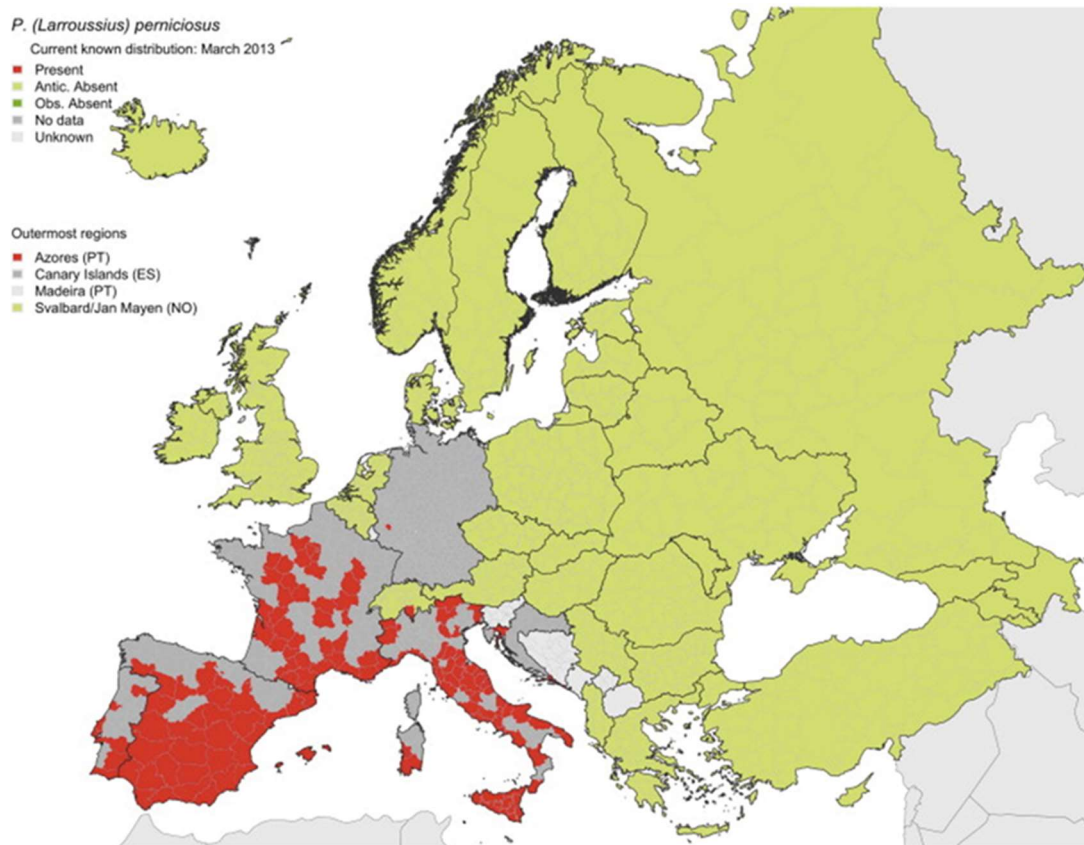
La leishmaniosis en España es una zoonosis endémica presente en la mayor parte del territorio peninsular e Islas Baleares. El parásito causante, tanto en las formas viscerales como cutáneas, es *L. infantum* y siendo el perro el principal reservorio, aunque hay otros posibles como gatos, roedores y liebres (Ruiz-Fons, 2013).

Su consideración previa como enfermedad de interés endémico regional hace pensar que anteriormente estuviera infranotificada. En los últimos años se ha visto que se distribuye prácticamente por todo el territorio, con diferente riesgo según la región y existe la posibilidad de que haya casos importados. De los flebotomos competentes para transmitir la infección por *L. infantum* existen dos especies distribuidas por todo el territorio peninsular, y por tanto el riesgo de transmisión de puede presentarse en cualquier área en donde se den las condiciones apropiadas (Prado, Del, De, & De, 2012). El número de casos notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica se mantiene en unos niveles constantes.

Los primeros datos que tenemos sobre la existencia de los flebotomos en España se remontan a 1911. Arias Encobet, al realizar un estudio sobre la distribución geográfica de los Dípteros en España, cita a *P. papatasi* que había sido capturado por Lauffer en El Escorial. En España peninsular y Baleares hay un total de 11 especies diferentes de flebotomos y si incluimos a las Islas Canarias éstas aumentan hasta 13 especies (Gil-Collado, Márquez & Marín, 1989).

De todas ellas sólo las hembras del subgénero *Larroussius* son capaces de transmitir *Leishmania infantum*. Las especies potencialmente vectores de leishmaniosis zoonoantrópica por *Leishmania infantum* en España son: *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus*, *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis*, *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* y *Phlebotomus (Larroussius) langeroni* (Lucientes, Castillo, & Gracia, 2005). Hay dos especies, *P. perniciosus* y *P. ariasi*, que se encuentran ampliamente distribuidas por toda España y que son los principales vectores demostrados. El más abundante es *P. perniciosus*. *P. ariasi* se asocia con ambientes frescos y húmedos. Para algunos autores, *P. longicuspis*, distribuida en el sur de España, se cree que es la misma especie que *P.*

*perniciosus* porque las hembras son similares y solo se distinguen algunos detalles de los machos y además pueden cruzarse entre sí. Finalmente, *P. langeroni* es una especie rara relacionada con los ambientes muy áridos de la meseta Central y el Valle del Ebro (Lucientes et al., 2005) (Mapa 5).



Mapa 5. Distribución de *P. perniciosus* en Europa. Modificado de (ECDC; 2013).

Poco después de que, en 1905, Píanesse identificara en Nápoles, en niños afectados de “anemias esplénicas”, un parásito morfológicamente similar a los descritos en 1903 por Leishman y Donovan en enfermos de kala-azar indio, se sospechaba que también existía esta parasitosis en España. Esta posibilidad se confirmó en 1912 por Pittaluga en la comarca de Tortosa (Tarragona). Un año más tarde y en esta misma zona se reveló el primer caso de leishmaniosis canina (Botet Fregola, Portús Vinyeta, 1993).

Progresivamente se fue comprobando que éstas eran enfermedades relativamente frecuentes, que afectaban extensas áreas del país y para las cuales existían, ya antes de conocer su etiología, nombres populares: “bazo de leche”, “mal de melsa”, “llosa”, para el kala-azar y pupa viva, “llunari” para el botón de Oriente (Botet Fregola, Portús Vinyeta, 1993).



El kala-azar del mediterráneo se diferencia del indio por la edad de los pacientes, afectando fundamentalmente a niños entre los 6 meses y los 3 años de edad, aunque, y de forma esporádica, también se registraban casos en adultos (“Leishmaniosis,” n.d.).

Las zonas consideradas de endemia han permanecido estables a lo largo del tiempo. En principio se pensó que, tal como ocurría en Francia, el kala-azar estaría limitado a zonas costeras de baja altitud, pero los focos de la Sierra de Gredos y Madrid hicieron variar estos conceptos. Los desplazamientos de la población en el transcurso de la guerra civil ocasionaron un aumento del número de casos, que en las áreas endémicas del Levante español, Murcia, Castellón y Barcelona, registraron un fuerte aumento en los años cuarenta. Después, y probablemente a causa de las campañas antipalúdicas, con la utilización masiva de insecticidas, se produjo un descenso en la morbilidad. La localización de la enfermedad en lugares concretos e incluso familias, que enfatizó y puso de manifiesto la relación de la pobreza y la falta de higiene con esta infección.

El número de casos notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica se mantiene en unos niveles constantes, aunque el número de ingresos por leishmaniosis asociada a infección con VIH debería estar disminuyendo por el efecto de la terapia antirretroviral altamente efectiva (INE Salud Carlos III, 2017).

La enfermedad en nuestro país sigue tres patrones de presentación. Patrón endémico, en el que los casos de enfermedad se presentan de forma esporádica y el perro actúa como principal reservorio. Casos asociados a coinfección con VIH y a pacientes inmunodeprimidos. En el caso de coinfección con VIH, la aparición de casos de leishmaniosis se asocia, por un lado, a la existencia de inmunodepresión como factor activador de la infección latente y por otro, a la transmisión del parásito entre los usuarios de drogas por vía parenteral (Monge-Maillo et al., 2014). Y finalmente, brotes epidémicos, como el que está teniendo lugar en la Comunidad de Madrid. Este brote comenzó en julio de 2010 y hasta el momento no se ha dado por concluido. Los cambios medioambientales en la zona y la presencia de un nuevo reservorio han contribuido a la evolución de la situación (Suárez Rodríguez et al., 2012). El brote aludido está teniendo lugar en los municipios al suroeste de la ciudad de Madrid, con un elevado número de casos (782, desde que comenzó en 2010) y con la peculiaridad de tener a la liebre (*Lepus granatensis*) y conejo (*Oryctolagus cuniculus*) como reservorios potenciales del parásito. (Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012).

En la última década las Comunidades Autónomas que han notificado casos son: Andalucía, Aragón, Baleares, Cantabria, Castilla-León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Madrid, Murcia, Navarra y La Rioja.

Desde el año 1996 hasta el 2011, en España la incidencia media anual notificada estuvo alrededor de 0,45 casos/100.000 hab. En este periodo, las mayores cifras de incidencia se registraron en la Comunidad Autónoma de Baleares, donde se llegaron a alcanzar TI de 4,72 y 4,59/100.000 hab. en 2005 y 2006, respectivamente. Durante ese periodo, otras comunidades autónomas como Valencia, Madrid, Andalucía o Cataluña mostraron tasas de incidencia superiores a la media (Sanidad, 2012).

Durante el año 2017 y 2018 se notificaron, respectivamente, 420 y 356 casos de leishmaniosis, que correspondían a unas TI de 0,88 y 0,70. De los casos, el 95,9% fueron confirmados y hubo 23 importados en 2017 y 39 en 2018. La evolución de las TI de casos autóctonos ha sido ascendente desde 2012 hasta 2017 y ha disminuido en 2018, tanto en hombres como en mujeres (INE Salud Carlos III, 2018). Las CCAA con mayor número de casos en 2017 fueron la Comunidad Valenciana (151), Comunidad de Madrid (78) y Cataluña (63), y en 2018 la Comunidad Valenciana (118), Cataluña (56) y Madrid (47). Las TI más altas correspondieron en 2017 a la Comunidad Valenciana (3,06), Baleares (2,41) y Madrid (1,20) mientras que en 2018 fueron la Comunidad Valenciana (2,38), Baleares (2,12) y Castilla-La Mancha (0,79). Asturias, Ceuta y Melilla no han notificado casos en este período.

Agregando los casos de 2017 y 2018, se han notificado durante todo el año, con máximos en enero (94 casos) seguido de abril y mayo (77 y 72 casos), y mínimos en agosto y septiembre (37 y 34 casos).

Las condiciones que pueden aumentar la incidencia de la leishmaniosis estarán asociadas al aumento en el número de vectores infectados con *L. infantum*, el aumento de la densidad del flebotomo en un área geográfica y a la aparición de nuevos reservorios en zonas muy visitadas por las personas.

## Leishmaniosis y las Fuerzas Armadas

La leishmaniosis ha aparecido durante décadas entre la población de soldados que han participado en las operaciones militares, en particular en Oriente Medio y Asia central. Históricamente, la leishmaniosis ha sido una de las principales causas de

morbilidad por enfermedades infecciosas entre el personal militar desplegado en el Medio Oriente (Korzeniewski, 2009).

Durante la Segunda Guerra Mundial, entre los años 1943 y 1944, se detectaron más de un millón de casos de leishmaniosis cutánea entre los soldados estadounidenses desplegados en Irak e Irán (Kitchen, Lawrence, & Coleman, 2009). Así mismo, se describieron al menos cincuenta casos de leishmaniosis visceral en soldados destacados entorno al mar Mediterráneo en los que se desató una enfermedad grave que produjo numerosas muertes (Crum et al., 2005).

En las fuerzas aliadas en el Medio Oriente, durante la "Guerra de los Seis Días" en 1967, se produjeron 1.500 casos de leishmaniosis cutánea LC y 50-75 casos de leishmaniosis visceral LV, hasta el 50% de las fuerzas israelíes que operaban en partes del valle del Jordán estaban infectadas con *Leishmania*. El 20% del personal asignado a la Fuerza Multinacional y Observadores (MFO) en el desierto del Sinaí en Egipto en 1990 desarrolló LC. Durante la operación tormenta del desierto (SAO), se registraron 20 casos de LC y 12 de LV entre los 697.000 soldados aliados desplegados en Península de Arabia en 1990 y 1991 (Burkett, Knight, Dennett, Sherwood, Rowton, Coleman, et al., 2007)

Durante la presencia de las fuerzas soviéticas en Afganistán en la década de los 80 el Ejército Rojo sufrió una mezcla heterogénea de males infecciosos. Se estima que la tasa de ataque anual de enfermedades infecciosas entre las tropas se situó entre el 53% y el 69%. La forma cutánea de la enfermedad se hizo patente a gran escala después de su regreso a casa, consecuencia lógica de su largo periodo de incubación. No se han podido encontrar referencia ni siquiera a número aproximado de enfermos en esta operación y durante este periodo (Korzeniewski, 2009).

Las actividades militares y los conflictos también pueden incrementar la incidencia de la enfermedad. En Colombia, las operaciones militares en la selva han ocasionado, entre 2008 y 2018, más de 45185 casos de LC y 559 casos de LMC en soldados (Méndez-Bejarano et al., 2020).

En soldados del Reino Unido y de los EE.UU. destinados en Irak y Afganistán se han producido miles de casos. En noviembre 2004, se habían identificado 1.178 casos de LC en personal militar de EE.UU, y el 18,3% de los efectivos alemanes desplegados en la misma época resultaron afectados (Van Thiel et al., 2010). En la operación "Libertad

Iraquí”, 19 casos entre el contingente militar británico, 186 entre las tropas holandesas y 14 entre los soldados alemanes, aunque probablemente estos números sean una subestimación (Burkett, Knight, Dennett, Sherwood, Rowton, Coleman, et al., 2007). Entre noviembre de 1990 hasta diciembre de 1991, siete hombres de los efectivos estadounidenses que participaron en la Operación Tormenta del Desierto se vieron afectados por una forma atípica de leishmaniosis que afectaba a órganos internos (Kizer, Joseph, Moll, & Rankin, 1995).

### Participación española en misiones internacionales

En los últimos treinta años España ha participado en las siguientes operaciones internacionales, bien con características estrictamente militares, establecimiento y mantenimiento de la paz, o bien con carácter humanitario:

- EUMAM RCA (República Centroafricana). Misión de la Unión Europea en la República Centroafricana orientada a la formación y la reforma de las Fuerzas Armadas de ese país. 22 abril de 2015 el Congreso de los Diputados autoriza la participación de España en la misión que permanece abierta en la actualidad.

- Asistencia a Irak. Tras el derrocamiento del régimen de Sadam Husein, tropas multinacionales desplegaron en Irak para estabilizar y reconstruir el país. Las fuerzas españolas desplegaron en Irak para participar en dos misiones distintas. La primera, de ayuda humanitaria, denominada Sierra Juliet, se desarrolló en el sur del país, en Um Qasar, entre abril y junio de 2003. En agosto se produjo el despliegue de la Brigada Multinacional Plus Ultra con la misión de contribuir a la seguridad y la reconstrucción en las provincias de An Nayaf y Al Qadisiya. España aportó un contingente de 1.300 militares. La Brigada 'Plus Ultra' se completó con tropas de El Salvador, Honduras, Nicaragua y República Dominicana. Distribuidos en dos relevos, los militares españoles permanecieron en la zona hasta finales de mayo de 2004. El 27 de mayo 2004 la Brigada Multinacional Plus Ultra II regresa a España.

- Ayuda a Haití. Misión humanitaria para atender a los miles de damnificados por el terremoto que asoló Haití en 2010. La primera ayuda humanitaria enviada por España a Haití llegó el 14 y 15 de enero en aviones fletados por el Ejército del Aire. En ellos también viajaron 40 miembros de la Unidad Militar de Emergencias especialistas en rescate, sanidad y transmisiones, miembros de la Guardia Civil, del SAMUR, voluntarios y personal de la AECID. Un total de 423 militares, una unidad con 27 médicos y sanitarios

y 23 guardias civiles. La misión se desarrolla entre el 14 de enero y el 21 de mayo de 2010.

- Bosnia-Herzegovina. Es la primera misión en el exterior con despliegue de contingentes operativos de cascos azules. Más de 46.000 militares españoles han participado desde 1992 en las sucesivas misiones en Bosnia-Herzegovina, primero de la ONU y después de la OTAN y la UE. De ellos, 23 fallecieron. Actualmente se mantiene una representación de cuatro militares en el Cuartel General de EUFOR Althea, en Sarajevo. El 8 de noviembre de 1992 se incorpora a UNPROFOR la primera agrupación del Ejército de Tierra.

- Operación Alfa-Charlie (Huracán Mitch). Misión humanitaria en Centroamérica puesta en marcha tras el desastre provocado por el paso del huracán Mitch a finales de octubre de 1998. La participación española repartió la ayuda humanitaria, realizó atención sanitaria y reconstrucción de infraestructuras desde el 5 de noviembre de 1998 hasta 18 de diciembre de 1999.

- Operación Respuesta Solidaria. Misión humanitaria para socorrer a las miles de víctimas del tsunami que asoló las costas de Indonesia a finales de 2004 y en ella participaron cerca de 600 militares españoles y se desarrolló desde el 8 de enero al 29 de marzo 2005.

- Operación Respuesta Solidaria II. Misión humanitaria internacional para socorrer a las víctimas del terremoto que sufrió Pakistán en octubre de 2005. En ella participaron 370 militares españoles. El 29 de octubre de 2005 comienza el despliegue de las tropas españolas en Pakistán. En enero de 2006 regresan a Valencia los militares españoles desplegados en la zona tras 90 días de misión.

- Primera guerra del Golfo. España contribuyó a la operación de embargo marítimo a Irak con medios navales y aéreos durante un año y desplegó un contingente en ayuda del pueblo kurdo. 586 hombres y mujeres de la Agrupación Táctica Alcalá con efectivos de la Brigada Paracaidista del Ejército de Tierra desplegaron en la localidad de Zajo y Shiladiza con la misión de distribuir ayuda humanitaria a los refugiados, prestarles atención sanitaria y facilitar su movilidad. El 2 de agosto de 1990 tiene lugar la invasión de Kuwait. 26 de agosto. Parten de España la fragata Santa María y las corbetas Descubierta y Cazadora. El 17 de enero comienza la operación Tormenta del desierto y el 24 de febrero. Inicio de la campaña terrestre. El 26 de abril despliega la agrupación

Alcalá en las localidades de Zajo y Shiladiza en el marco de la operación Provide Comfort. 24 de junio concluye la misión de las tropas.

- Resolute Support (Afganistán). España ha participado, durante 19 años (2002-2021), con las fuerzas de la OTAN que han luchado contra la insurgencia y ayudado a la reconstrucción del país. Inicialmente participó en la operación Libertad Duradera. La mayor aportación de nuestro país, sin embargo, se produjo en el marco de la ISAF (International Security Assistance Force). Los primeros 350 militares fueron enviados a Kabul el 24 de enero 2002. El 12 de mayo de 2021 después de 19 años de misión regresan a España los últimos 24 militares.

- UNAVEM I y II (Angola). La Misión de Verificación de Naciones Unidas en Angola (UNAVEM) fue la primera operación de paz en la que participó España.

- República Centroafricana (EUFOR RCA). Un contingente de la Unión Europea se desplegó en Bangui para proteger a la población de la violenta capital centroafricana. La misión (EUFOR RCA), formada por 650 efectivos, contribuyó a proteger a la población y facilitó el retorno de desplazados y la reactivación de la actividad económica. El 14 de mayo de 2014 llega a Bangui el primer contingente español de EUFOR RCA. Casi un año después de su inicio, la misión tocó a su fin el 15 de marzo de 2015.

- Kosovo (KFOR). España contribuyó durante diez años a la Fuerza Internacional de Seguridad para Kosovo (KFOR), liderada por la OTAN. En el otoño de 1999, se desplegó en Kosovo la Fuerza Internacional de Seguridad (KFOR), un contingente de 50.000 militares encargado de vigilar el cese de las hostilidades y adiestrar a los componentes de las nuevas fuerzas de seguridad kosovares, multiétnicas, profesionales y voluntarias dedicadas a labores de control del orden público y de protección civil. El número de militares desplegados se fue reduciendo progresivamente conforme mejoraban las condiciones de seguridad. Alrededor de 22.000 militares españoles entre junio de 1999 y septiembre de 2009 participaron en esta misión. El 19 de septiembre 2009 finaliza la participación española en KFOR.

#### Otras operaciones

- EUTM-Somalia. La Unión Europea adiestra a las fuerzas somalíes para combatir el terrorismo y la piratería. En esta operación participan 125 efectivos de once países de la Unión Europea

- EUTM-Malí. La misión de la UE ayuda al Ejército maliense a mejorar sus capacidades militares, proporciona al Ejército maliense entrenamiento militar y

asesoramiento en las cadenas de mando y control, logística y gestión de recursos humanos, junto con derecho internacional humanitario. Actualmente, la contribución española a esta misión es de, aproximadamente, unos 500 militares

- Apoyo a Irak - Inherent Resolve - NATO Mission-Irak. Militares españoles adiestran al Ejército iraquí como parte de la coalición internacional de lucha contra el Daesh, también se asesora al gobierno de Irak en el ámbito de la estructura de seguridad nacional. Desde octubre de 2018, Alrededor de 150 militares españoles contribuyen a la coalición internacional.

- Apoyo a Turquía. Una batería Patriot española protege a la población turca de posibles ataques con misiles desde la vecina Siria. En la actualidad, la Unidad Patriot está constituida por un total de 149 militares.

- Fuerza Interina de Naciones Unidas en el Líbano (FINUL). Los cascos azules de la ONU patrullan en el sur del Líbano para evitar enfrentamientos entre Líbano e Israel. En la actualidad, forman parte de la misión 10.587 personas de 40 naciones. Las Fuerzas Armadas españolas desplegaron en el Líbano en septiembre de 2006. El contingente español que llegó a contar con un máximo de 1.100 militares se mantiene desde 2012 entre 600 y 700. A día de hoy, hay alrededor de 650 militares desplegados.

- Presencia Avanzada Reforzada-Letonia. Garantizar la estabilidad de la seguridad euroatlántica, mantener una Europa en paz, unida y libre, así como prevenir conflictos mediante medidas de defensa y disuasión creíbles. En noviembre de 2017 despliega la Unidad del Ejército español en Adazi (Letonia). 4000 militares componen los cuatro grupos tácticos multinacionales. En el grupo táctico 'Letonia', junto a los militares españoles, también desplegarán efectivos de Canadá, Albania, Eslovenia, Italia y Polonia, España contribuye con unos 305 efectivos.

- Seguridad Cooperativa en Mauritania. España apoya a Mauritania con un programa bilateral de actividades de adiestramiento en el ámbito de la Seguridad. No existe un contingente permanente en zona. Desde 2016, se han desplegado más de 400 militares españoles.

[Datos de zonas de despliegue relacionadas con el riesgo de leishmaniosis.](#)

Antigua Yugoslavia.

Bosnia i Herzegovina ocupa una superficie de 51.200 kilómetros cuadrados. No tiene salida al mar, excepto por una costa de 20 km en el mar Adriático. Limita al norte

principalmente con Croacia, al oeste y suroeste con Croacia y el mar Adriático, y al este y sureste con Serbia y Montenegro. (Mapa 6). Es principalmente montañoso con varios picos que superan los 1.900 m de altitud. Las tierras bajas con suelos fértiles se encuentran en el norte. La elevación más alta del país es un pico cerca de Maglic (al sureste de Sarajevo), que alcanza los 2.386 m. Tiene un clima continental, cálido en verano y frío en invierno. En Sarajevo, las temperaturas alcanzan mínimas de -26°C en enero y máximas de 37° C en julio y agosto. En elevaciones altas, los veranos son cortos y frescos, y los inviernos son largos y severos. La nieve es frecuente y permanece en el suelo durante varios meses. Los inviernos son suaves y lluviosos a lo largo de la costa del Adriático. Es uno de los países menos urbanizados de Europa. El uso de la tierra incluye: 14% cultivables, 25% cultivos o pastos permanentes y 39% bosques. La composición religiosa es 40% musulmana, 31% cristiana ortodoxa, 15% católica romana, 4% protestante y 1% otra. La cultura es tradicionalmente masculina, y los lazos familiares, étnicos y culturales son fuertes. La guerra civil comenzó en 1992 y ha perturbado gravemente gran parte de la infraestructura del país. El gran número de personas desplazadas y los esfuerzos actuales de reintegración han alterado significativamente la composición étnica y la densidad de población. La población total es de 3.281.000 (2020) y la densidad de población es de 68,97 hab./km<sup>2</sup> (2013).

Las principales fuentes de agua incluyen ríos, arroyos y pozos. El agua está disponible perennemente en todo el país. Desde el comienzo de los combates en 1992, la limitada infraestructura del país colapso. Muchas casas han sido arrasadas, dañadas o destruidas intencionalmente por los combates. El desplazamiento interno de grandes porciones de la población indígena degradó el medio ambiente a través de la eliminación indiscriminada de desechos sólidos y municipales. El gran número de refugiados, el saneamiento y el tratamiento deficientes del agua, y el apoyo médico interrumpido aumentó el riesgo de epidemias. Los suelos contaminados durante décadas con desechos industriales peligrosos, como los PCB, plantean riesgos adicionales para la salud humana.

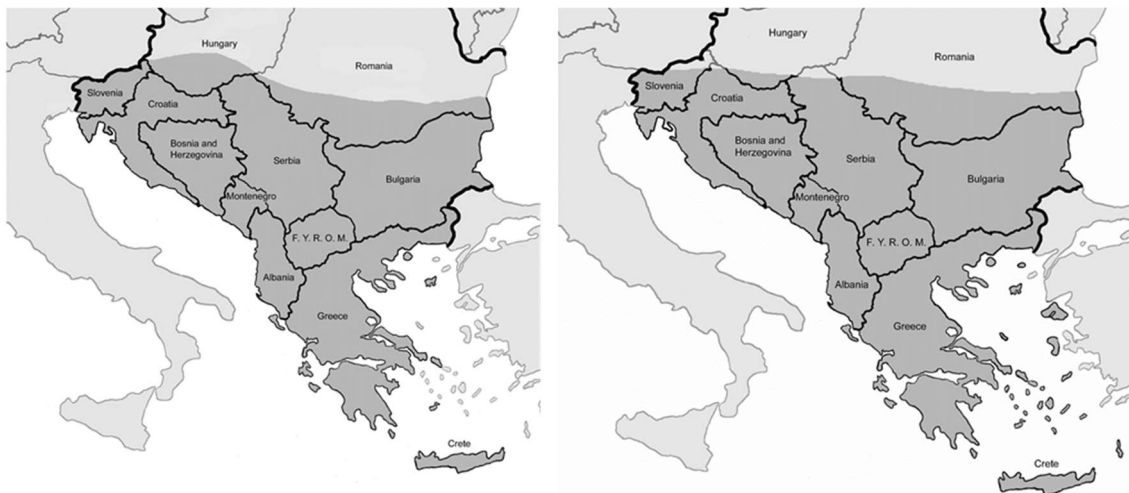
La transmisión de LC debido por *L. tropica* se encuentra en centros urbanos y aldeas rurales de las tierras altas en, Bosnia y Herzegovina, Croacia, Macedonia, Serbia, Montenegro y Eslovenia (Mapa 7). La enfermedad está muy extendida en áreas con un clima templado (cuenca mediterránea). La LV por *L. infantum* extendida en la cuenca mediterránea y el sur de Europa, esta también presente en partes de Bosnia y Herzegovina,



Croacia, Macedonia, Serbia y Montenegro y Eslovenia, aunque no es altamente endémica.



Mapa 6. Bosnia i Hercegovina.



Mapa 7. Distribución de LC (Dch.) y LV (Izq). en la Región de los Balcanes. Modificado de (Gingrich, Harlan, Perkins, & Trosper, 2001).

## Líbano

Líbano tiene una superficie de 10.400 kilómetros cuadrados, y se puede dividir en cuatro áreas fisiográficas. (1) Una estrecha llanura costera (conocida localmente como

sahil) se extiende a lo largo del Líbano y varía en anchura de 1,5 a 12 km, con su punto más ancho en el norte. (2) Bordeando la llanura hacia el este se encuentran las montañas del Líbano, que se elevan bruscamente a una serie de crestas y crestas, alcanzando hasta los 3.000 m sobre el nivel del mar en varios lugares. (3) Las montañas del Líbano caen bruscamente hacia el este, formando la principal zona agrícola del país, el valle de Beka'a, que está a unos 900 m sobre el nivel del mar y de 8 a 16 km de ancho. (4) Las montañas Antilíbano tienen una elevación media de 2.000 m, con una elevación máxima que alcanza los 2.800 m sobre el nivel del mar, y se elevan desde el valle oriental de la Beka'a para formar la frontera entre el Líbano y Siria (Mapa 8). Tiene un clima mediterráneo, con variaciones regionales. Las tierras bajas costeras se caracterizan por veranos calurosos (junio a septiembre), con temperaturas máximas y mínimas medias diarias de 30°C y 20°C y máximas y mínimas de 41°C y 13°C. El Valle de Beka'a tiene temperaturas medias máximas y mínimas diarias de verano de 34°C y 13°C, con temperaturas extremas de 42°C y 7°C. Las zonas montañosas permanecen más frescas, produciendo temperaturas medias diarias máximas y mínimas de verano de 23°C y 11°C, con extremos de 29°C y 3°C a 1.900 m de altitud. Las temperaturas invernales (diciembre a marzo) a lo largo de la costa alcanzan un máximo diario medio y mínimo de 19°C y 9°C, con extremos de 35°C y 0°C. El Valle de Beka'a tiene temperaturas medias diarias máximas y mínimas invernales de 14°C y 0°C, con extremos de 25°C y -7°C; heladas, nieve y un viento severo del norte ocurren ocasionalmente. Las montañas tienen temperaturas medias diarias máximas y mínimas invernales de 13°C y -3°C, con extremos de 18°C y -11°C a 1.900 m. Líbano recibe casi todas sus precipitaciones de octubre a abril. La precipitación anual es de aproximadamente 700 mm en la costa, más de 1.200 mm en las montañas y unos 890 mm en el valle de Beka'a. La nieve cubre los picos de las montañas gran parte del año. La población del Líbano es en gran parte urbana y en su mayoría alfabetizada. Líbano, uno de los países más densamente poblados de Oriente Medio, con una población total de 6.006.668 hab. (2016), presente una densidad de población de 560 hab./km<sup>2</sup>. Aproximadamente la mitad de la población total reside en la ciudad capital de Beirut y sus suburbios. La población está formada por un 95% de árabes, un 4% de armenios, franceses y asirios, y un 1% de otros. Sin embargo, sus persuasiones religiosas son 70% musulmanas y 20% cristianas. Las condiciones de vida y sanitarias en el Líbano son deficientes. Las instalaciones sanitarias básicas sólo existen en algunas viviendas urbanas. Las principales ciudades han combinado sistemas de drenaje de aguas residuales y pluviales, pero carecen de instalaciones adecuadas de tratamiento de aguas residuales.

Las aguas residuales comúnmente se descargan sin tratar en ríos, arroyos y el Mar Mediterráneo. La falta de una eliminación adecuada de los desechos es un problema importante en todo el Líbano. Las grandes ciudades recolectan desechos sólidos, que luego se arrojan a lo largo de la costa o se queman en lotes baldíos. La basura de la eliminación indiscriminada se acumula en las calles, donde atrae a las alimañas. Las aguas residuales crudas y los desechos industriales contaminan la mayoría de las fuentes de agua superficial. Los servicios de tratamiento y distribución de agua son irregulares. Aunque la mayoría de las áreas urbanas tienen instalaciones de tratamiento de agua, la integridad de los sistemas urbanos de tratamiento y distribución de agua se han visto comprometidos por la negligencia, el mantenimiento deficiente, las fluctuaciones intermitentes de energía y los cambios de presión. Las acumulaciones de basura, desechos y basura (a veces en las calles junto a las casas) atraen a un gran número de artrópodos y roedores. La acumulación de agua proporciona muchos criaderos para los mosquitos. El agua y los desechos pueden apoyar el desarrollo y la supervivencia de una variedad de patógenos y parásitos humanos, que se propagan por vectores residentes.

La LC debido por *L. major* ("llaga húmeda") es común en Israel, Jordania, Líbano, Siria, y el sur de Turquía (Mapa 9). Disfruta de un clima semiárido a árido con una estación seca cálida que dura seis o más meses, en la que las temperaturas del aire superan regularmente los 35°C y con frecuencia superan los 40°C. Las ubicaciones se encuentran en áreas de bajo relieve, en su mayoría casi planas, y comparten suelos lo suficientemente profundos y friables para la construcción de madrigueras de roedores profundas y duraderas. La enfermedad es generalmente endémica en las zonas rurales donde los roedores coloniales reservorios (jirds o jerbos), como *Rhombomys*, *Psammomys* o *Meriones*, y el vector demostrado, *Phlebotomus papatasi*, están presentes. Los sistemas de madrigueras de estos animales proporcionan protección contra los extremos de temperatura externa y desecación, y contienen cantidades considerables de desechos orgánicos. La transmisión antroponótica de la LC debido a *L. trópica* se encuentra en los centros urbanos y se está haciendo más común en las aldeas rurales de las tierras altas en el Líbano, Jordania e Israel. La enfermedad está muy extendida en áreas con un clima templado (cuenca mediterránea), y con un clima árido y cálido (Jordania, Israel, Egipto, etc.).

La LV por *L. infantum*, como en otros países de la cuenca mediterránea, en Oriente Medio, se informa de partes de Chipre, Israel, Líbano, Jordania, Siria, y el sur de Turquía,

(Mapa 9). No es altamente endémica. La LV causada por *L. donovani* es rara en esta región.

Kuwait.

La superficie terrestre de Kuwait se estima en 17.820 kilómetros cuadrados incluyendo varias islas en alta mar. El terreno es en su mayoría desierto plano, a excepción de algunos oasis y la cresta Ahmadi de 120 m de altura que corre de norte a sur, separando la parte central del país de una estrecha llanura costera. La interrupción de la superficie por las operaciones militares durante la Guerra del Golfo Pérsico de 1991 y los vientos del desierto han alterado la topografía de Kuwait al aumentar el tamaño y el movimiento de las dunas de arena. La isla Faylakah, a 19 km de la costa, es la única isla habitada kuwaití. Tiene un clima desértico subtropical con dos estaciones distintas. El verano (mayo a octubre) produce un pico de temperatura alta de 48°C y un mínimo de 14°C, con una temperatura diaria promedio alta, de 40°C y un mínimo diario promedio de 33°C. Las temperaturas diurnas pueden variar hasta 10°C. Frecuentes tormentas de arena, causadas por vientos áridos “Shamal”<sup>1</sup>, soplan a través del Golfo Pérsico. El invierno (noviembre a abril) produce un pico de temperatura alta de 39°C y un mínimo de 1°C, con una temperatura diaria promedio alta, de 28°C y un promedio diario bajo de 9°C. El invierno trae todas las escasas precipitaciones anuales de Kuwait de 25 a 175 mm, que a veces son lo suficientemente pesadas como para producir pequeñas inundaciones locales. Los extranjeros constituyen aproximadamente el 55% de los 4.052.584 hab. de población de Kuwait, con una Densidad 200,2 hab./km<sup>2</sup> que es engañosa, porque grandes áreas del desierto están deshabitadas y muchas áreas urbanas están densamente pobladas. La población es 45% kuwaití, 35% otros árabes, 9% del sur de Asia, 4% iraní y 7% otros. En comparación con la mayoría de los otros países de Oriente Medio, las condiciones de vida y sanitarias de Kuwait son buenas, pero por debajo de los estándares occidentales, especialmente en el saneamiento de los alimentos. Para las poblaciones rurales y los habitantes más pobres de las ciudades, la vivienda, el suministro de agua, el saneamiento de los alimentos y los sistemas de eliminación de desechos siguen estando muy por debajo de los estándares occidentales. La presencia de vectores no está tan extendida o es tan significativo en Kuwait como en la mayoría de los demás países de la región, pero hay

---

<sup>1</sup> El Shamal es un viento del noroeste que sopla sobre Irak y los estados del golfo Pérsico, a menudo fuerte durante el día, pero disminuyendo por la noche. Este efecto del tiempo puede ocurrir una vez al año o varias veces, principalmente en el verano, pero a veces también en el invierno.

todavía numerosos sitios donde la eliminación de desechos, la acumulación de basura o la fuga de agua han permitido una notable acumulación local de vectores.

En el Medio Oriente *L. major* es común en la península arábiga, al norte en Arabia Saudita y al sur en Yemen (Mapa 8). La enfermedad es endémica en las zonas rurales con importantes colonias de reservorios silvestres y presencia del vector. La LC antroponótica por *L. tropica* es cada vez más común en las aldeas rurales de Arabia Saudita.

La LV producida por *L. infantum* se encuentra en el norte y el sur de Arabia Saudita, y los países árabes vecinos de Bahrein, Qatar, Emiratos Árabes Unidos, Kuwait, Omán y Yemen (Mapa 9), aunque no muy prevalente. La LV por *L. donovani* se considera endémica, pero con caso aislados en Kuwait, los casos recientes de VL se registran como importados.

Irak.

Irak tiene una superficie terrestre de 437.854 kilómetros cuadrados (Mapa 8). Se compone de amplias llanuras desérticas, colinas y montañas. Dos ríos importantes, el Éufrates y el Tigris, fluyen hacia el sureste a través del país hasta el Shatt al Arab<sup>2</sup> (elevación de 2,5 m sobre el nivel del mar), que desemboca en el Golfo Pérsico. La mayor parte de la población se concentra a lo largo de estos ríos. Irak se puede dividir en cinco áreas fisiográficas: (1) El área de las Montañas Zagros es amplia, áspera y pedregosa, y se extiende a lo largo de las fronteras de Irán y Turquía. Numerosos picos superan los 3.281 m. (2) El área de Foothills es montañosa y está atravesada por valles profundos que contienen arroyos de montaña. La elevación varía de 215 a 1.143 m sobre el nivel del mar. (3) El área de Al-Jazira (isla árabe) es una llanura con algunas colinas y montañas bajas; La elevación es de unos 160 a 1.570 m sobre el nivel del mar. (4) Los Desiertos del Norte y del Sur son llanuras desnudas con una elevación máxima de unos 910 m en el oeste. Un cinturón de dunas de arena separa la frontera oriental del río Éufrates. (5) La llanura de la Baja Mesopotamia está compuesta por gruesas capas de sedimentos de los ríos Tigris y Éufrates y depósitos arrastrados por el viento. La elevación se extiende desde el nivel del mar hasta aproximadamente 30 m sobre el nivel del mar. Los veranos son extremadamente calurosos, secos y casi sin nubes (mayo a octubre) producen temperaturas que pueden alcanzar un máximo diario de 50°C y un mínimo vespertino de

---

<sup>2</sup> El Shatt al-Arab, también conocido como Arvand Rūd, es un río en el suroeste de Asia de unos 200 km de longitud, formado por la confluencia de los ríos Éufrates y Tigris en la ciudad de Al-Qurna, en la provincia de Basora

3°C. Las temperaturas más bajas ocurren en las tierras altas del noreste. Los meses de invierno (noviembre a abril) producen temperaturas que pueden alcanzar un máximo diario de 43°C y un mínimo vespertino de 4°C. Las temperaturas más bajas ocurren en las tierras altas del noreste. De diciembre a febrero es la temporada más húmeda. La precipitación es más alta en el noreste de Irak, que recibe de 381 a 483 mm de lluvia al año y nieve hasta 3 meses al año. La humedad relativa más alta ocurre durante la estación húmeda, excepto en Al Basrah, que tiene mucha humedad y pocas precipitaciones durante todo el año debido a su proximidad al Golfo Pérsico. Las tormentas de polvo y arena ocurren todo el año y son más severas entre mayo y octubre. La alta tasa de crecimiento de la población de Irak y la situación política podrán empeorar las condiciones de vida de la mayoría de los segmentos de la población. La población es de 40.222.503 (2020) con una densidad de 82.7 hab./km<sup>2</sup>, aunque varía de 944 hab./km<sup>2</sup> en el área de Bagdad a 56 hab./km<sup>2</sup> en el área de Dahuk en el norte de Irak y 4 hab./km<sup>2</sup> en el área de Al-Anbar en el oeste de Irak. La población es 79% árabe, 16% kurda, 3% persa y 2% turca. Las condiciones sanitarias están por debajo de los estándares occidentales en la mayor parte de Irak y continúan deteriorándose, especialmente en el área de Basora. Los sistemas de tratamiento y distribución de agua en la mayor parte del país son viejos, están mal mantenidos y tienen fugas. Las aguas residuales, la escorrentía superficial e incluso los animales muertos a menudo contaminan las fuentes de agua potable y los tanques de almacenamiento. Las aguas residuales urbanas a veces inundan casas y calles debido a estaciones de bombeo eléctricas que no funcionan, y las aguas residuales sin tratar se vierten en fuentes de agua superficial, incluida los ríos Tigris y Éufrates. Los vertidos indiscriminados se producen en las afueras de las ciudades. Los barrios marginales en expansión imponen exigencias adicionales a una infraestructura urbana ya sobrecargada. Estas condiciones atraen fácilmente a las moscas de la suciedad, los roedores y las plagas de aves carroñeras. El agua derramada, especialmente sin tratar, proporciona criaderos de mosquitos, ratas, caracoles huéspedes de parásitos humanos y una amplia variedad de patógenos humanos. El agua con un alto contenido orgánico asegura que grandes poblaciones de vectores de enfermedades y parásitos se reproduzcan en estrecha asociación con las poblaciones humanas. Varias enfermedades de importancia militar son endémicas en dichos sitios.

La leishmaniosis es una amenaza persistente para la salud del personal militar porque las tropas se despliegan o realizan ejercicios militares en lugares donde la

enfermedad es endémica. La LC es altamente endémica en el Medio Oriente, y en algunas áreas el 80-90% de las personas tienen cicatrices de *Leishmania*. Los soldados expuestos a las picaduras de flebotomos mientras están desplegados en la región son muy susceptibles a la infección por *Leishmania*. La inmunidad entre el personal militar es esencialmente inexistente y la recuperación de LC no confiere inmunidad frente a LV.

La LC debido por *L. major* ("llaga húmeda") es común en todo Medio Oriente. La enfermedad es generalmente endémica en las áreas rurales (Mapa 9). El clima es de semiárido a árido con una estación seca cálida que dura seis meses o más, en la que las temperaturas del aire superan regularmente los 35°C y frecuentemente superan los 40°C. en áreas de bajo relieve, casi planas, y suelos lo suficientemente friables para la construcción de madrigueras donde están presentes los roedores reservorios (jirdos o jerbos), como *Rhombomys*, *Psammomys* o *Meriones*. La forma antroponótica de LC por *L. tropica* ocurre en los centros urbanos de Irak.

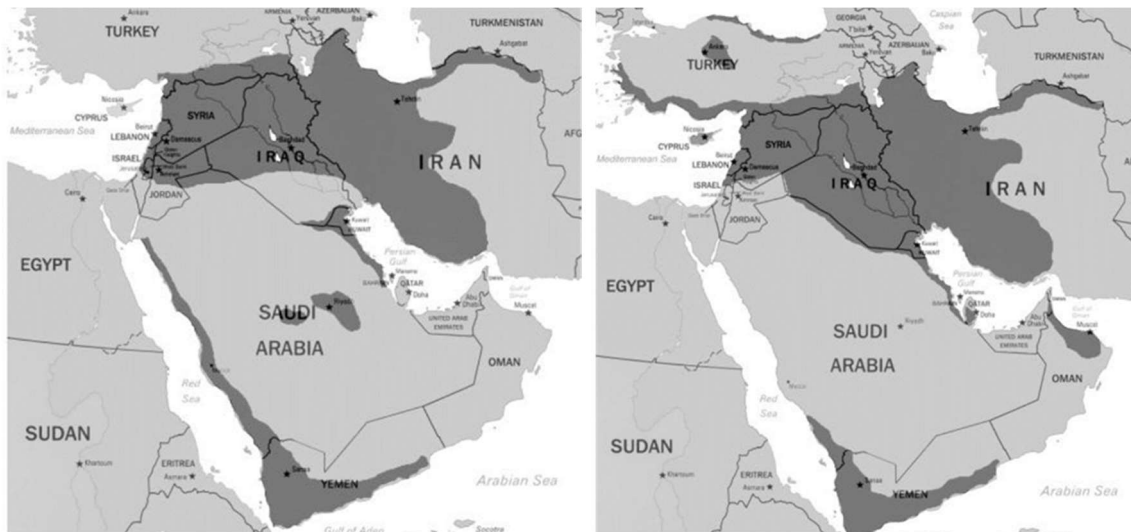
La LV producida por *L. infantum* ocurre en Irak y se informa de forma tímida, (Mapa 7). La LV por *L. donovani* reapareció en el norte de Irak y se extendió al centro en la década de 1970. En 1973 se registraron 1.100 casos, la mayoría de los cuales ocurrieron en Bagdad y sus alrededores.

El vector demostrado de *L. major* en la región es *P. papatasi*, y los vectores sospechosos incluyen *P. alexandri*, *P. ansarii*, *P. bergeroti*, *P. caucasicus* y *P. salehi*. El vector para *L. tropica* en la región es *P. sergenti*. Vectores sospechosos de *L. tropica* son *P. chabaudi*, *P. saevus* y *P. sergenti*. Vectores probados o sospechosos de *L. infantum* en el Medio Oriente son *P. brevis*, *P. halepensis*, *P. kandelakii*, *P. kryreniae*, *P. longiductus*, *P. negligencias*, *P. simici*, *P. tobbi* y *P. transcaucasicus*. Desde el norte de África a través de Irak e Irán hasta el oeste de China, el vector comprobado de *L. donovani* es *P. alexandri*. La preparación de posiciones terrestres con búnkeres militares en áreas desérticas proporciona sitios de descanso diurno para los flebótomos. En áreas urbanas, los adultos de flebotomos a menudo descansan en rincones oscuros, frescos y húmedos de zonas inhabitadas estructuras humanas y animales. Las estructuras abandonadas y el sobrecrecimiento vegetal en su entorno se convierten en hábitats atractivos de roedores silvestres y focos de LC rural.





Mapa 8. Oriente Medio.



Mapa 9. Áreas endémicas en LC (Izq.) y LV (Dch.) en OM. Modificado de (FGS, 1999)

Afganistán.

Más de 1 millón de personas están en riesgo de hambruna constante, innumerables miles viven en condiciones miserables en campos de refugiados en Talacon, en el este de Afganistán, y cerca de Herat, en el oeste de Afganistán (Mapa 10). Más de 1 millón de refugiados afganos permanecen en Pakistán desde el éxodo durante la guerra con la Unión



Soviética. Las enfermedades infecciosas son comunes en estos campos de refugiados que se caracterizan por el hacinamiento, las malas condiciones sanitarias y la desnutrición.

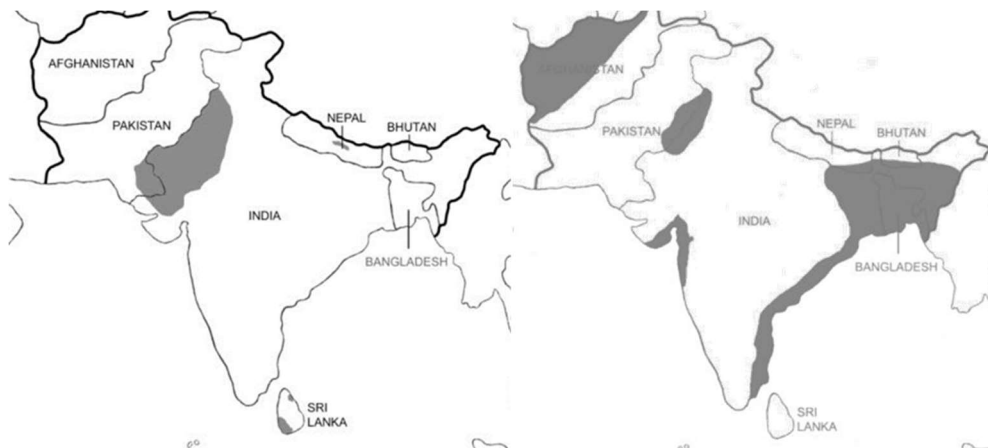
Afganistán es una nación económicamente pobre, cuya infraestructura médica, educativa e industrial ha sido casi destruida por 2 décadas de guerra internacional y civil. Se estima que 2 millones de personas murieron y 6 millones de refugiados huyeron a Irán y Pakistán entre 1979 y 1989. Del casi 1 millón de refugiados desplazados internos en todo Afganistán, aproximadamente 500.000 son de Kabul y residen en campos de refugiados cerca de Jalalabad. No se han abordado problemas económicos y de salud pública, ya que el país carece de gobierno funcional. La población de Afganistán es mayoritariamente rural y analfabeta. La mayoría de las personas son pobres, a menudo nómadas, y los medios de subsistencia están estrechamente relacionados con la tierra. Los grupos étnicos son ferozmente independientes. Las personas se identifican principalmente sobre la base del lenguaje. La composición étnica de la población es de aproximadamente 38 % pashtunes (afganos), 25 % tayikos, 19 % hazara y 12 % uzbekos, turcomanos y otros. La composición religiosa de la población es aproximadamente 84% musulmana sunita, 15% musulmana chiíta y 1% otros. Población total 38.071.754 hab. (estimación de 2021) con una densidad media de 48.08 hab./km<sup>2</sup>. La tasa de alfabetización 32%, aunque la tasa de analfabetismo femenino se estima en 85%. Más de la mitad de la población urbana total vive en la capital, Kabul.

Las condiciones de vida están marcadas por escasez estacional de agua, las fuentes de agua incluyen ríos, arroyos, nieve derretida, zanjas de riego, canaletas y pozos abiertos. Un tercio de la población de Kabul recibe agua de sistemas de agua corriente, y el resto obtiene agua de pozos públicos o privados. Los sistemas de tratamiento y distribución de agua no son confiables. La contaminación de los suministros de agua potable es un grave problema de salud pública. Las condiciones sanitarias son deficientes en todo el país. La eliminación de aguas residuales sanitarias es ineficaz. En Kabul, los sistemas de tanques sépticos están en mal estado y la defecación indiscriminada es común. Los canales de drenaje transportan desechos humanos y otros desechos directamente al río Kabul y espacios abiertos en la ciudad. Estos canales a menudo se desbordan en las calles durante las lluvias de primavera. La higiene personal deficiente y el saneamiento de alimentos inferior es la norma en todo el país. En consecuencia, las enfermedades como el cólera, la shigelosis, la fiebre tifoidea, la hepatitis viral y las infecciones intestinales por helmintos son comunes en todo el país.

La leishmaniosis ha sido una amenaza persistente para el personal militar. La transmisión antroponótica de LC debida a *L. tropica* aparece en centros urbanos y aldeas rurales de las tierras altas de Afganistán. La enfermedad está muy extendida en áreas con clima árido y frío en Afganistán y Pakistán. En la transmisión zoonótica de LC por *L. major* ocurre en pequeñas aldeas o áreas rurales de Afganistán (Mapa 11). Es focalmente endémica y ha sido descrita como uno de los principales problemas de salud pública en Afganistán, donde el reservorio es el gran jerbo, *Rhombomys opimus*.



Mapa 10. Afganistan.



Mapa 11. Distribución de la LC (Izq.) y de la LV (Dch.) en Sur-Centro Asia. Modificado de (Board, 2001).

## Medidas preventivas adoptadas por los contingentes

El control de las enfermedades de transmisión vectorial ha sido siempre un elemento central en el objetivo de proteger sanitariamente a los contingentes desplazados fuera de territorio nacional. Dentro del planteamiento general de control de las enfermedades de transmisión vectorial, y de forma especial a partir de los despliegues en Medio Oriente, se establece un plan de control de la leishmaniosis dentro del cual se articulan en: un plan de vigilancia o programa de vigilancia, un plan el control de vectores, un plan de control de reservorios y un plan de formación e información del personal. En general, todas estas actividades se han programado y ejecutado conjuntamente y bajo las mismas directrices que aplicaban los contingentes de otras naciones para cada una de las zonas de operaciones.

### Programa de vigilancia.

Además de la información de inteligencia sanitaria de la que se dispone con carácter previo a los despliegues, se establece en cada uno de ellos un sistema de vigilancia de los artrópodos presentes en la zona. Esta vigilancia se realiza esencialmente a través de la realización de capturas de especímenes y adicionalmente, mediante la realización de inspecciones en las zonas y emplazamientos en los que se van a ubicar o se han ubicado ya, las bases y destacamentos o posiciones, así como, de información recogida en los puestos de atención sanitaria (Role) de los mismos. El objetivo del plan o programa es, en primer lugar, monitorizar las poblaciones de artrópodos. En segundo lugar, identificar o determinar las especies más importantes. En tercer lugar, poder realizar una evaluación de los cambios en las poblaciones en función del tiempo (estacionalidad, climatología y disponibilidad de nutrientes y refugio) y, finalmente, evaluar la eficacia de los programas de control. Cuando se considera necesario y es factible, determinar la presencia de agentes infecciosos y la detección de posibles focos de enfermedad. Las conclusiones de los programas de vigilancia permiten implementar sistemas de protección preventiva y, sobre todo, recopilar información para trasladarla al mando sanitario de las operaciones, de tal forma que pueda elaborar la formulación de las políticas sanitarias frente a la amenaza de las enfermedades de transmisión vectorial en la zona de operaciones. De la alerta temprana resultará el posterior establecimiento de los planes de control. Los planes de control se establecen con carácter general frente a todas las enfermedades de transmisión vectorial y hay dos aspectos importantes a destacar con

respecto a la leishmaniosis: por un lado, el hecho de que el ciclo de vida del vector no se acopla con el ciclo del resto de los dípteros que actúan como vectores, en particular con los anofelinos y los culicinos, y por otra parte, que el control de los reservorios puede variar sustancialmente en función del área geográfica en la que se lleve a cabo el despliegue. Teniendo en cuenta las mencionadas peculiaridades el plan de control cuenta con los 3 ejes de actuación que se detallan a continuación.

#### Plan de control de vectores

El objetivo del plan de control de vectores es reducir la población de flebotomos mediante el uso de varias técnicas clásicas de control disponibles en las Fuerzas Armadas. La responsabilidad del control de plagas recae sobre la veterinaria militar que dispone a tal fin de los medios materiales (equipos de aplicación eficaces y de alto rendimiento) y humanos (oficiales veterinarios, personal auxiliar aplicador) para la ejecución de las medidas de sanidad ambiental que sean necesarias, tanto en territorio nacional como en zona de operaciones. Todos los contingentes cuentan con estos medios y su dotación está acorde con cada despliegue y las necesidades del mismo. El programa de control de flebotomos tiene cuatro componentes: el primero la aplicación de insecticidas en forma de aerosol, ya sea por nebulización, termonebulización u ultra bajo volumen (ULV), con la utilización de vehículos o por medio de equipos portátiles; en segundo lugar, la aplicación de los insecticidas residuales, generalmente de acción por contacto, para la impregnación de superficies, tanto exteriores como interiores, en edificios, contenedores, tiendas de campaña y cualquier otro elemento que se considere necesario incluidos los vehículos. Además, se realizan acciones encaminadas a destruir el hábitat del vector, siempre que esto sea posible, y al control de los yacimientos existentes de éstos como de aquellas estructuras con posibilidad de servir como lugar de reposo y reproducción. En su conjunto, la mayoría de las medidas están enfocadas al control de los insectos adultos y una parte de ellas, a dificultar su reproducción.

Las fumigaciones aéreas, ya sean por nebulización, termonebulización o ULV, tienen un impacto limitado en el control de los flebotomos, pero representan un apoyo inexcusable cuando se toma en consideración el control de todos los vectores artrópodos en general.

Las pulverizaciones residuales se aplican por lo general mediante rociadores manuales o de mochila. No se puede decir que las pulverizaciones tengan un impacto

significativo, pero suele ser mayor que al que contribuyen las fumigaciones, en tanto que evitan de forma apreciable el contacto de los vectores con las personas cuando aquellos se aproximan a las zonas de vida para localizar al hospedador humano. Una variante interesante, con relación a las pulverizaciones, es la utilización de polvo con insecticidas persistentes en las bocas de las madrigueras de los reservorios mamíferos, estas zonas son propicias para el alojamiento y la cría de los vectores y hay una alta probabilidad de que en ellas se desarrollen las formas inmaduras de los flebotomos. Se carece hasta la fecha de datos acerca de la eficacia de este procedimiento, aunque se presume que es su huella en el control sea significativa.

Es posible que el impacto específico de los programas de control de vectores sobre el control de los flebotomos haya sido limitado, no obstante, su ejecución es necesaria a nivel global por su contribución en la reducción de exposición del personal.

#### Plan de control de reservorios

El primer hecho que se toma en consideración es la gran cantidad de perros asilvestrados, que además de padecer unas condiciones sanitarias deplorables, deambulan constantemente en el entorno de las bases y posiciones. Existe una probabilidad muy alta de que estos animales entren en contacto con el personal. La presencia de perros oficiales, pertenecientes a los contingentes y que desarrollan misiones de enorme importancia, complica la situación. La posibilidad de contacto con los asilvestrados puede provocar no solo la pérdida de un efectivo canino de gran valor táctico, sino también un aumentando del riesgo de contagio para su guía y el resto del personal miliar que interactúe con él. Los perros oficiales están bajo estricto control veterinario. Un hecho cierto es que a pesar de la información recibida y de las órdenes establecidas, los soldados muestran, en algunas ocasiones, una actitud humanitaria hacia los animales abandonados. Esto ha conducido a situaciones de gran carga emocional cuya solución genera problemas importantes. La adecuada gestión de este problema es de gran importancia ya que en más una ocasión se han producido contagios de importantes enfermedades. Por lo tanto, este es un aspecto sobre el que se centran muchos de los esfuerzos de los servicios veterinarios durante los despliegues y donde más hincapié se hace con ocasión de las actividades formativas o informativas. Además de los mencionados caninos y otros animales peridomésticos, hay que prestar atención a otros cánidos salvajes y fundamentalmente, a los roedores.

El control de los perros oficiales está perfectamente establecido en las normas correspondientes y estas son escrupulosamente respetadas siendo responsabilidad de los oficiales veterinarios su ejecución y vigilancia. Con respecto a los animales asilvestrados, los veterinarios de los contingentes llevan a cabo continuamente capturas que en la mayoría de los casos terminan en sacrificios por la imposibilidad de realizar otro tipo de gestión de los animales, en cualquier caso, cuando se llega a este extremo siempre se vigilan escrupulosamente las medidas de bienestar animal y los sacrificios son humanitarios siendo necesarios para evitar los riesgos que ocasiona su presencia. A pesar de que esta vigilancia se realiza sin pausa resulta imposible eliminar por completo este componente de riesgo si bien se ve sustancialmente reducido. Es evidente que ha sido un componente esencial para evitar riesgos sanitarios de todo tipo y particularmente, en relación con la leishmaniosis.

El control de los roedores es también responsabilidad de los oficiales veterinarios. Aunque existen medidas de carácter general, los planes siempre se han ajustado a las particularidades de cada despliegue y se han tomado siempre en consideración las fluctuaciones de las poblaciones, que por lo general tienen una marcada dependencia estacional, para intensificar las actuaciones en estos periodos. Los trabajos se inician con las inspecciones pormenorizadas de las bases y posiciones y de los entornos suficientemente extensos, con evaluación inicial de las poblaciones y planteamiento de las actuaciones. El objetivo es siempre la eliminación completa de las diversas especies que convivan en los entornos de los despliegues. La eficacia de los planes depende del mantenimiento de la monitorización constante a fin de detectar de forma temprana la presencia de nuevos individuos cuando se produce la recolonización de las áreas sometidas a control. Para la ejecución del plan se dispone de una amplia gama de dispositivos porta cebos y trampas. No se tiene constancia de que ningún animal atrapado presentará la enfermedad y en ningún caso se han realizado muestreos de los mismos para investigar la presencia o contacto con el parásito.

#### Establecimiento del programa de educación para la salud del personal desplazado

Con carácter general, todo el personal militar recibe durante el periodo de instrucción básica formación en materia de protección de la salud sobre la base de las medidas de protección individual. Esta formación es posteriormente completada por una formación de carácter específico en las propias unidades de destino. Generalmente esta

formación es más específica en función de las actividades más habituales llevadas a cabo por cada tipo de unidad en concreto. A esta formación básica y complementaria se le añade la formación específica para cada participación en misiones en el extranjero. Todo miembro del contingente es formado específicamente con relación a los riesgos con los que va a encontrarse durante el desempeño de su misión y de cómo hacerles frente. Esta formación corre a cargo de los oficiales veterinarios que forman el propio contingente y que acompañan a este en el transcurso de la emisión. Por regla general, todo el mundo conoce la leishmaniosis con anterioridad al alistamiento de una misión, gracias a la formación inicial y complementaria; tienen datos sobre la enfermedad, los signos, síntomas y medidas preventivas. Durante las fases de concentración se informa además de los aspectos relacionados con las medidas de protección personal, los procedimientos diagnósticos y tratamientos, el ciclo biológico del parásito y cómo identificar las situaciones de riesgo frente a él. Las cuestiones más frecuentes que se suelen plantear durante estas actividades tienen que ver con el período de incubación de la enfermedad tras el contagio, la ausencia de procedimientos vacunales y profilaxis en comparación con otras enfermedades de transmisión vectorial, los tratamientos, las características de la lucha frente a los vectores y la justificación de algunas de las medidas de control de reservorios y, especialmente, todo lo relacionado con el control de perros. El resultado es que todo el personal alcanza los objetivos de conocer los aspectos relacionados con la etiología, la prevención, el diagnóstico y tratamiento de forma clara y precisa. En esta fase se informa y adiestra sobre el uso adecuado de las medidas de protección personal y de su importancia.

El objetivo de los responsables de los planes es que todo el personal conozca las medidas de protección personal. De forma resumida se centran en tres líneas fundamentales: el uso de los repelentes, el uso adecuado de los uniformes y las medidas preventivas a considerar durante las pernoctaciones y estancias prolongadas al aire libre. La información acerca de las medidas de protección personal y la vigilancia de su cumplimiento se realiza tanto en territorio nacional como en las diferentes zonas de operaciones. La información se lleva a cabo partiendo de los responsables sanitarios de las grandes unidades y, de forma descendente, hasta los comandantes de las pequeñas unidades que en última instancia hacen llegar la información al personal bajo su mando. En el caso de las operaciones, la responsabilidad recae sobre los oficiales veterinarios del contingente y la formación se realiza, como se ha dicho, durante las jornadas previas al



despliegue durante las cuales, además, se comunica toda la información de inteligencia sanitaria de la que se dispone. La vigilancia del cumplimiento se realiza a dos niveles, tanto en territorio nacional como en zona de operaciones. En primer lugar, por parte de los comandantes de las pequeñas unidades sobre el personal bajo sus órdenes, y en segundo lugar, por el oficial veterinario mediante inspecciones, encuestas y entrevistas en los ROLE o botiquines de Base. De las deficiencias observadas en el cumplimiento de las medidas de protección personal, se emiten informes. No existe en la actualidad un repertorio completo de todos los informes realizados durante los últimos 30 años, pero obstante si se tiene constancia de las conclusiones más importantes extraídas de los mismos:

- El cumplimiento de las medidas de protección personal en relación con la uniformidad se ve seriamente comprometido por el intenso calor al que en ocasiones se ven expuestos los soldados.
- La mayoría de los soldados no trataban sus uniformes con piretrina.
- Cuando se realizan las pernoctaciones al aire libre, en muchos casos no se utilizan las mallas mosquiteras, en algunos casos por no haber disponibilidad y en otros el uso era inadecuado, como por ejemplo utilizándolas pegadas al cuerpo.
- A pesar de la profusa disponibilidad de repelentes de uso tópico, a veces no eran utilizados y se aludió este rechazo en ocasiones a la desconfianza en su efectividad y el olor desagradable del compuesto, y otras veces a la suspicacia sobre la seguridad de los compuestos sobre la piel.
- En algunos casos se recogieron quejas emitidas por parte de los soldados referentes a la falta de protección aportada por el compuesto, lo que condujo a conclusiones como que la aplicación no había sido completa en la piel expuesta o que la duración de la protección se veía aminorada por las durísimas condiciones climáticas que aumentaban la evapotranspiración corporal y una más rápida eliminación del compuesto.

En resumen, aunque es imposible determinar los casos reales de contagios que se han podido producir en el transcurso de los últimos años con ocasión de la participación en las misiones internacionales, tanto de personal militar como civil, las acciones realizadas han sido eficaces. Las Fuerzas Armadas han implantado medidas para reducir



los riesgos de la leishmaniosis en todas las misiones, con carácter más específico en las que se han llevado a cabo en Irak, Afganistán y Líbano y en general, son similares en cada situación. Estas tienen que ver con mejorar las condiciones de vida del personal dotando, por ejemplo, con aire acondicionado las zonas de descanso, sensibilizando al personal acerca del riesgo de la leishmaniosis, enfatizando la importancia de la aplicación de las medidas de protección personal y mejorando las actividades de control de plagas.

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

## Justificación

Tener la máxima información acerca del grado de exposición a una enfermedad de transmisión vectorial y evaluar las medidas preventivas para evitar el contagio es una prioridad en cualquier colectivo. La exposición a la leishmaniosis por parte de los miembros de las Fuerzas Armadas ha sido objeto de inquietud del mando desde que se iniciaron los primeros despliegues fuera de Territorio Nacional con ocasión de la participación en operaciones de establecimiento y mantenimiento de la paz (Bosnia-Herzegovina, Kosovo) o por razones humanitarias (Haití, Indonesia, Pakistán, etc.). El diseño y la implementación de las medidas preventivas supuso, desde los primeros momentos, una intensa labor de recopilación de datos y diseño de los procedimientos y, posteriormente, de la ejecución de estos. A pesar de ello, en los últimos años se han detectado casos en personal repatriado con posterioridad a la participación en los contingentes.

El hecho de que España esté situada en una de las áreas europeas con una mayor prevalencia de leishmaniosis canina, y la aparición de brotes de la enfermedad relacionados con la participación de lagomorfos como principales reservorios, hacen sospechar que, aunque con un menor nivel de riesgo, la enfermedad puede ser contraída por el ser humano también en territorio nacional, aunque las tasas de incidencia sean sensiblemente inferiores a las que pueden encontrarse en las zonas de operaciones en las que se haya participado o exista la posibilidad de hacerlo en un futuro.

Si bien ciertamente los brotes importantes han tenido carácter puntual en nuestro país, las actividades de instrucción que se realizan de forma constante en los campos de maniobras pueden suponer una exposición superior a la que se ve sometida la población general. En este sentido, debemos tener en cuenta la presencia del vector y la abundancia de los nuevos reservorios salvajes detectados en algunas de las zonas de mayor actividad militar.

## Objetivos

Los objetivos planteados en el presente trabajo se centran en responder a las siguientes cuestiones:

1. Estudiar si la participación en operaciones que se desarrollan en áreas o regiones hiperendémicas a las diferentes formas de leishmaniosis supone un aumento de la exposición a los flebotomos y, en consecuencia, del contacto con el parásito y desarrollo de la enfermedad, y a que puede ser debido.

2. Establecer si existe un riesgo adicional de los miembros de las Fuerzas Armadas de contraer la Leishmaniosis visceral en Territorio Nacional como consecuencia de llevar a cabo de forma frecuente y periódica, actividades de adiestramiento en los Campos de Tiro y Maniobras (CTM) en los que existe la presencia de flebotomos y reservorios de la enfermedad, aunque se mantenga entre ellos un ciclo selvático. Se tomará como referencia concreta al CTM de Renedo-Cabezón y la Base El Empecinado, en Valladolid.

3. Estudiar si los procedimientos no invasivos (a partir de pelo) constituyen un método adecuado para la determinación de la enfermedad o la exposición al agente y, si en base a ellos, se puede establecer un sistema útil de monitorización que revele la prevalencia de la enfermedad, tanto entre los reservorios salvajes como en el hospedador incidental humano.

4. Determinar los niveles de parasitación de los reservorios y la presencia del parásito entre los vectores para establecer los niveles de riesgos con relación a las actividades de instrucción y en el desarrollo de operaciones.

5. Someter a juicio las medidas preventivas efectuadas o ejecutadas de forma rutinaria para evitar el contagio tanto en zona de operaciones como en territorio nacional.

# Detección de *Leishmania infantum* mediante PCR en tiempo real (qPCR) en conejos salvajes

---

(Ayuso-Sáinz et al., 2022, *Med. Weter.* 78(2), 91-94, DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.6615).

## Introducción

Leishmaniosis es una zoonosis mundial causada por el protozoo *Leishmania*, siendo *L. infantum* la causa más importante de leishmaniosis en perros y en personas con el sistema inmune deprimido en el área mediterránea (WHO, 2010).

Los parásitos de *Leishmania* se han identificado en un gran número de reservorios animales salvajes en los que los insectos *Phychodidae* de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* actúan como vectores (Ashford, 2000; WHO, 2010). Existe un gran número de animales salvajes de diferentes órdenes que están adaptados a la infección por parte de *Leishmania spp.* (Ashford, 1996), al contrario que en el caso de los perros y los humanos (Alvar, Vélez, Bern, Herrero, Desjeux, Cano, Jannin, & Boer, 2012; Ruiz-Postigo, Grout, & Jain, 2020). El orden *Rodentia* tiene el mayor número de reservorios salvajes para todas las especies de *Leishmania* (Burza et al., 2018).

El orden *Lagomorpha* se ha convertido en un objetivo de estudio debido a un brote epidémico aparecido en Madrid de 2009 a 2020, en el que se vieron afectadas alrededor de 500 personas con el sistema inmune deprimido y que presentaron síntomas clínicos tanto en piel como en vísceras (Arce et al., 2013; Jiménez et al., 2014). *Leporidae* (especialmente *Oryctolagus cuniculus* y *Lepus granatensis*) fueron los reservorios responsables de la transmisión de *L. infantum* a *Phlebotomus perniciosus* que estaba presente en el área (Jiménez et al., 2014; R. Molina et al., 2012b). *Leporidae* está muy adaptada a la infección por *Leishmania* y no desarrollan una forma visceral de la enfermedad como sí sucede en cánidos y humanos (Burza et al., 2018). Estudios recientes en conejos revelaron la ausencia de lesiones histológicas típicas de leishmaniosis, así como unas cargas de parásitos bajas. Se ha probado que la piel es el órgano con la mayor carga del parásito, acentuando su importancia tanto para el diagnóstico como para la

transmisión de los mosquitos (Jiménez et al., 2014; Ortega-García et al., 2019). Los estudios de xenodiagnóstico demostraron la capacidad de las liebres para transmitir *L. infantum* a *P. perniciosus* (Jiménez et al., 2014; R. Molina et al., 2012b) y la detección de *L. infantum* en *P. perniciosus* en el mismo foco de leishmaniosis en España (E. González, Jiménez, Hernández, Martín-Martín, & Molina, 2017; E. González et al., 2021; Jiménez et al., 2013).

Se han desarrollado distintos métodos serológicos de diagnóstico, tales como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), DFA (Direct Fluorescent Antibody test) e IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Technique), para el diagnóstico de leishmaniosis en conejos y liebres, así como métodos parasitológicos tales como cultivos y PCR en tiempo real en bazo, hígado y piel (Chitimia et al., 2011; García et al., 2014; I. Moreno et al., 2014). Recientemente, se ha demostrado que las muestras de pelo pueden utilizarse para el diagnóstico molecular de *L. infantum* y *L. major*, y para ser usadas en infecciones experimentales, clínicas y epidemiológicas (Belinchón-Lorenzo et al., 2013; Iniesta et al., 2013; Muñoz-Madrid et al., 2013). Además, el pelo es fácil de obtener sin causar daño a los animales, y permaneciendo estable el ADN kinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* en su interior durante el tiempo y después de condiciones ambientales extremas (Muñoz-Madrid et al., 2013).

El estudio de los mamíferos salvajes que actúan como reservorios es esencial para el control de la leishmaniosis. En España, la mayor parte de las investigaciones en conejos salvajes se realizaron en el área central de Madrid y en la costa sudeste del Mediterráneo. En el área de Castilla y León, el número de casos humanos fue de 15 de 2014 a 2018 (0,13-0,2 / 100.000 habitantes) (Martínez, Barroso, & Portero, 2019). Adicionalmente, los cambios ambientales como la desaparición de la agricultura, del ganado y de los usos tradicionales de las tierras, así como la presencia de hierbas y matorrales, la ausencia de predadores y competidores y las temperaturas más moderadas facilitan el ciclo vital y la reproducción de conejos y liebres (Arce et al., 2013).

Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar mediante qPCR la presencia de DNAk *Leishmania* en conejos salvajes que podrían actuar como reservorios de la enfermedad en un área de la provincia de Valladolid en Castilla y León cercana a Santovenia de Pisuerga, un pueblo de 5000 habitantes con cambios recientes donde las

hierbas y matorrales han cubierto grandes extensiones muy adecuadas para la proliferación de mosquitos.

## Material y Métodos

### Animales

Se capturaron 116 conejos salvajes entre Mayo de 2017 y Marzo de 2018 en Santovenia de Pisuerga, Valladolid (ETRS89 / UTM Zone 30). La zona de muestreo se dividió en 5 zonas: Zona 1 (Z1: 19 animales), Z2 (28 animales), Z3 (28 animales), Norte (Zn: 22 animales) y Sur (Zs: 19 animales) (Ilustración 5). Los animales fueron capturados (Cowan, 1984) bajo la autorización de las autoridades de Salud Pública de la Comunidad de Castilla y León, siguiendo la norma nacional RD 53/2013 y la Directiva Europea 2010/63/EU. Los conejos fueron transportados al laboratorio durante las 5 horas siguientes a su captura. No se observaron lesiones macroscópicas compatibles con infecciones subclínicas.

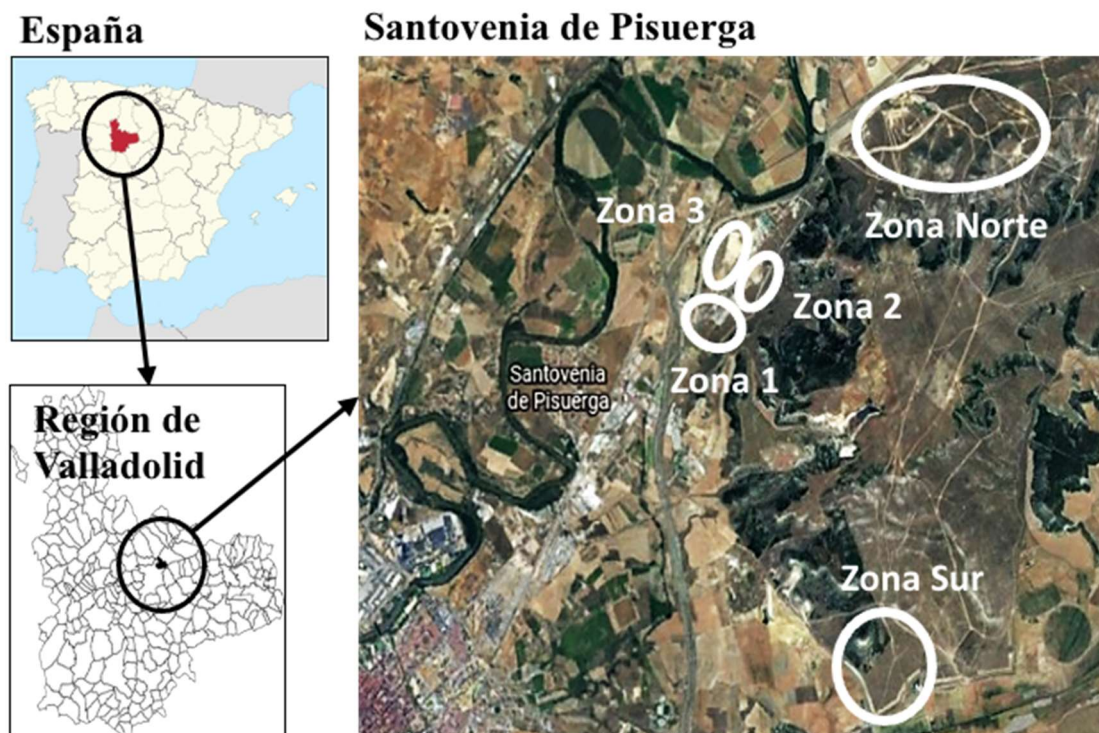


Ilustración 5. Geolocalización de las áreas en las que los conejos salvajes fueron capturados para la detección de *Leishmania*. Áreas en Santovenia de Pisuerga, Valladolid.



Muestras.

Se recogieron de 50 a 100 pelos utilizando tijeras a partir de dos zonas corporales (espalda y flanco) y se introdujeron en bolsas de plástico estériles y fueron enviadas al laboratorio (Ilustración 6). Los bazos fueron extraídos de los animales, almacenados en bolsas de plástico estériles, y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción del ADN.



*Ilustración 6. Conejos capturados, sacrificados y muestreados en CMT Sur.*

#### *Extracción del ADN y los análisis de qPCR.*

Aproximadamente 20 pelos y 20 mg de bazo de cada animal se introdujeron en microtubos estériles de tapón roscado e incubados durante la noche a  $56^{\circ}\text{C}$  en 250  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (10 mM TrisCl, 0,1 M EDTA, 0,5% SDS) con 100 mg/ml de Proteinasa K. El ADN se extrajo utilizando 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante obtenido a partir de las muestras procesadas con el GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La técnica qPCR utilizada se desarrolló siguiendo protocolos previamente publicados (Belinchón-Lorenzo et al., 2016). Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo in placas de 96 celdillas en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  (4  $\mu\text{l}$  de ADN + 16  $\mu\text{l}$  de Reaction Mix), conteniendo 20  $\mu\text{M}$  de cada primer (Leish 1: 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' y Leish2: 5'-

ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), 10  $\mu$ M de TaqMan Probe (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB), y el iTaq Universal Probes Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). El ciclo térmico utilizado fue el siguiente: incubación a 50 °C durante 2 minutos, desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y una extensión de anillado a 60 °C durante 1 minuto. Cada amplificación se acompañó de controles positivos y negativos. El ADN extraído de 55.000 promastigotes de *L. infantum* MCAN/ES/1996/BCN150 zymodeme MON-1 fue utilizado como control positivo. El ADN extraído a partir de muestras de sangre de perro sano se usó como control negativo. Todos los análisis fueron llevados a cabo en un Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems Laboratories, Foster City, CA, USA). Con el fin de cuantificar el *Leishmania* kDNA, se elaboró una curva estándar utilizando ADN extraído a partir de 6 cantidades de parásitos de *L. infantum* (MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1) oscilando desde 50.000 a 0,5 (factor de dilución x10); el ADN fue extraído y analizado junto con las muestras de pelo por triplicado. El ciclo límite (threshold cycle, Ct), que se corresponde con el punto de intercepción en el eje Y para cada análisis (es decir, el valor Ct esperado para la cantidad estimada de 1 parásito), se utilizó como corte, siendo positivas aquellas muestras cuyos valores Ct fueron menores o iguales al valor de corte en el eje Y para cada ensayo. Los análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio LeishmanCeres, Unidad de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

## Resultados y Discusión

La Tabla 5 muestra los resultados de la qPCR tras el análisis de los pelos (de la espalda y del flanco) de conejos salvajes procedentes de la provincia de Valladolid. El método de la qPCR permitió detectar y cuantificar la presencia de *L. infantum* en 4 de los 116 (3,45%) animales analizados. El número de parásitos estimado en las muestras positivas fue variable, oscilando entre 2,60 y 276,60. La mayor cantidad de DNA del parásito se observe en el área geográfica Z1, siendo el número estimado de parásitos en el pelo de un individuo (No. 15) hasta 100 veces mayor que el observado en el resto de los animales. Los resultados procedentes del animal No. 12 dieron como resultado un valor Ct (32,15) cercano al límite (32,00), aunque fue considerado como negativo.



La Tabla 6 muestra los resultados positivos de la qPCR tras el análisis de los bazos de los animales. *L. infantum* fue detectado y cuantificado en 3 de los 116 (2,59%) animales analizados. El número de parásitos estimado en las muestras osciló entre 1,41 y 1,80. No se encontraron resultados positivos en los animales procedentes de las áreas Z1, Z2 y Z3.

La fiabilidad de los resultados fue valorada mediante el coeficiente  $R^2$  (desde 0,996 hasta 0,999), la pendiente o slope (desde -3,36 hasta -3,33) y la eficiencia alta alcanzada (entre 98,56% y 99,64%). Las muestras fueron consideradas positivas cuando el valor Ct de cada uno de los triplicados fue menor de 32,00 (muestras de pelo) o de 32,66 (muestras de bazo).

Las muestras de pelo pueden obtenerse mediante métodos no invasivos en los animales salvajes, y son estables a las condiciones ambientales durante el almacenamiento y transporte (Bengtsson et al., 2012; Garzel, Hankenson, Combs, & Hankenson, 2010; Gilbert et al., 2006). Además, el pelo protege al DNA parasitario de la degradación externa, el almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ , la desecación y la radiación UV (Muñoz-Madrid et al., 2013). Nuestros resultados demuestran que el pelo es una muestra apropiada para la detección de *Leishmania* en *Leporidae* salvajes.

La variabilidad observada entre los animales con respecto a la carga parasitaria estaba en concordancia con otros estudios previamente publicados en los que se describieron pocos animales positivos y poco impacto clínico (García et al., 2014; Ortega-García et al., 2019; Ortega et al., 2017). (Ortega et al., 2017) estudiaron la presencia de *L. infantum* en leporidos, detectando por primera vez DNA de *L. infantum* en el 67% (22/33) y en el 53% (17/32) de las muestras de pelo de conejos y liebres, respectivamente. Estos autores también encontraron que el 100% (7/7) de los conejos y el 33% (1/3) de las liebres fueron positivas a la presencia de *L. infantum* en todas las muestras estudiadas: bazo, piel y pelo. En cambio, en el presente trabajo no se encontraron identificaciones positivas de *L. infantum* en las muestras de pelo y bazo procedentes del mismo animal. Esto puede ser debido a que los mamíferos salvajes podrían actuar como reservorios asintomáticos ya que no se detectaron lesiones macroscópicas en el examen post mortem de los animales positivos (Ortega-García et al., 2019). Algunos autores (I. Moreno et al., 2014; R. J. Quinnell & Courtenay, 2009) publicaron que la ausencia de lesiones podría deberse a (i) una asociación reciente entre el hospedador y el parásito, (ii) a un número

bajo de parásitos o (iii) a una virulencia reducida del parásito maximizando su transmisión.

El conocimiento de la ecología de la leishmaniosis requiere mucho trabajo para identificar los hospedadores implicados en la enfermedad en distintas áreas geográficas. Los estudios con mamíferos salvajes necesitan técnicas caras basadas en análisis *post mortem* o muestreos *in vivo* (Muñoz-Madrid et al., 2013). Los estudios de xenodiagnóstico ya realizados con conejos salvajes y liebres ibéricas probaron que estos mamíferos son capaces de transmitir *L. infantum* a *P. perniciosus* siendo una evidencia importante de su papel en la transmisión de *Leishmania* incluso en los casos sin signos clínicos (R. Molina et al., 2012b).

En España, *L. infantum* se ha investigado en conejos salvajes y liebres en dos áreas geográficas, i.e., Madrid (Arce et al., 2013; García et al., 2014; Jiménez et al., 2014; Ortega et al., 2017) y la costa sureste mediterránea (Chitimia et al., 2011). En el presente estudio el área de muestreo está cercana a una pequeña población que recientemente ha sufrido el cambio de algunas de sus zonas agrícolas con la posibilidad de promover la extensión de mosquitos y conejos.

Nuestros resultados demuestran que el pelo es una muestra apropiada para la detección de *Leishmania* en *Leporidae* salvajes, tal y como ha sido también probado en otros mamíferos salvajes. Los resultados del presente estudio muestran la importancia del papel de los *Leporidae* salvajes (conejos en el presente trabajo) como reservorios de *Leishmania*, llevando a la necesidad de realizar estudios más extensos junto con investigaciones entomológicas para elucidar el posible papel de los conejos salvajes en un ciclo selvático de transmisión de *L. infantum* en esa área.

Tabla 5. Resultados del análisis de pelo con qPCR. El resultado positivo fue considerado cuando el valor medio Ct (a partir de los análisis realizados por triplicado) fue menor de 32,00. No se encontraron animales positivos al análisis de pelo en las áreas Z2,

ÁREA	NO. DE ANIMALES	NO. DE POSITIVOS	NO. DE ANIMAL	CT MEDIA	MEDIA DEL NO. DE PARÁSITOS ESTIMADOS
<b>Z1</b>	19	4	1-4, 8, 10, 14	ND	-
			5	36,75	-
			6	31,14	2,60
			7	37,68	-
			9	39,78	-
			11	38,40	-
			12	32,15	-
			13	35,93	-
			15	24,52	276,60
			16	27,38	36,45
			17	34,03	-
			18	29,46	8,67
			19	37,22	-
<b>Z2</b>	28	0	3-13, 15, 18, 20-28	ND	-
			1	35,61	-
			2	38,95	-
			14	38,76	-
			16	38,72	-
			17	36,91	-
			19	36,88	-
			2-28	ND	-
<b>Z3</b>	28	0	1	38,34	-
			1-22	ND	-
<b>ZN</b>	22	0	1-22	ND	-
<b>ZS</b>	19	0	1-19	ND	-

Tabla 6. Resultados positivos del análisis de bazos con qPCR. El resultado positivo fue considerado cuando el valor medio Ct (a partir de los análisis realizados por triplicado) fue menor de 32,66. No se encontraron animales positivos al análisis de bazo en las áreas Z1, Z3 o Zs. ND, no detectado

ÁREA	Nº. DE ANIMALES	Nº. DE POSITIVOS	Nº. DE ANIMAL	CT MEDIA	MEDIA DEL Nº. DE PARÁSITOS ESTIMADOS
<b>Z1</b>	19	0	4-19	ND	-
			1	37,00	-
			2	36,90	-
			3	39,28	-
<b>Z2</b>	28	2	1-8, 10-11, 13-14, 17, 19, 27	ND	-
			9	36,17	-
			12	39,70	-
			15	37,63	-
			16	32,82	-
			18	39,50	-
			20	35,37	-
			21	32,76	-
			22	32,26	1,42
			23	32,75	-
			24	34,18	-
			25	31,85	1,80
			26	34,78	-
28	33,13	-			
<b>Z3</b>	28	1	1, 5, 12, 17-20, 22-25, 27-28	ND	-
			2	35,93	-
			3	37,07	-
			4	37,35	-
			6	35,50	-
			7	37,29	-
			8	36,78	-
			9	35,46	-
			10	32,21	1,41
			11	39,93	-
			13	36,98	-
			14	37,01	-
			15	36,38	-
16	36,03	-			
21	38,69	-			
26	36,71	-			
<b>ZN</b>	22	0	1-5, 7-10, 12-22	ND	-
			6	37,52	-
			11	35,80	-
<b>ZS</b>	19	0	1-4, 6-14, 16-19	ND	-
			5	36,58	-
			15	39,88	-



# Detección molecular de *Leishmania* en flebotomos.

---

## Introducción

En España, la leishmaniosis es causada por *L. infantum* (OMS, 2010), notificándose esencialmente formas viscerales y, en mucha menor cuantía, cutáneas y mucosas (Gil-Prieto, Walter, Alvar, & De Miguel, 2011). El vector es la base de transmisión de la leishmaniosis en todo el mundo, incluidos los países mediterráneos. Los ciclos salvajes de *Leishmania* siguen siendo insuficientemente conocidos a pesar de su importancia sobre la epidemiología de la enfermedad. Hasta la fecha, los vectores implicados en la transmisión en España son *P. perniciosus* y *P. ariasi*. No hay certeza de la implicación de *Sergentomya minuta* (Pereira et al., 2017). Los casos de leishmaniosis en España se agrupan significativamente en la zona mediterránea y en la región central (INE Carlos III, 2018). En 2018, se notificaron 4 casos de leishmaniosis (1 caso en cada una de las provincias de Ávila, León, Salamanca y Valladolid), con una tasa de 0,2 casos por 100.000 habitantes en la región de Castilla y León (JCyL, 2019). Todos los casos se notificaron en hombres con una tasa de 0,3 casos por 100.000 habitantes.

La aparición en 2009 de un importante brote en la Comunidad de Madrid (Arce et al., 2013) cuyo reservorio son, fundamentalmente, liebres (*Lepus granatensis*) (Molina et al., 2012a) y, adicionalmente, conejos (*Oryctolagus cuniculus*), ambos con gran capacidad infectante para los vectores (Jiménez et al., 2014) y en consecuencia para el reservorio humano, acentúa la sospecha de que la prevalencia de *Leishmania* es mayor a la que inicialmente cabría esperar en virtud de la tasa que presenta en la población general (INE Carlos III, 2018), y por lo tanto, el riesgo de contagio también es mayor.

La abundancia de conejos en diferentes áreas de la península Ibérica, y la proximidad de éstos a otros animales salvajes como el zorro (*Vulpes vulpes*), que constituye un importante reservorio del parásito, permite presumir que el peso del agente entre ellos es muy importante, y que la difusión entre los conejos tiene que ser no sólo posible sino altamente probable, tratándose de una zona endémica como es España. Por otra parte, factores asociados a la actividad humana y el cambio climático están

influyendo en la distribución de *Leishmania* en partes del mundo muy diferentes (P. D. Ready, 2010).

En los últimos 30 años, y con ocasión de la inestabilidad política debido a los conflictos acaecidos en el Golfo Pérsico y Afganistán, un número importante de civiles y militares occidentales se han desplazado a Oriente Medio. Se trata de un área con intensa presencia de *Leishmaniosis*, lo que ha acarreado un número indeterminado de contagios. Sin embargo, el hecho de que se hayan producido contagios no implica que éstos hayan tenido lugar con ocasión de la participación en misiones internacionales en áreas endémicas; en este sentido, España es, en sí misma, un área endémica de LV por *L. infantum*, por lo que los lugares en los que, de forma habitual, se realizan los ejercicios militares pueden suponer una exposición y un riesgo de contagio. Se conoce la presencia del vector en las zonas determinadas para este estudio, se ha tenido en cuenta el papel que juega el conejo en el mantenimiento del ciclo epidemiológico de la enfermedad, y es notoria la gran abundancia de estos animales. Estos hechos hacen sospechar que el ciclo puede estar presente en un área en la que se realizan actividades con unas peculiaridades que exponen de forma particular al personal militar. Este personal se ha visto expuesto durante periodos más o menos prolongados al contagio a través del vector. Los acondicionamientos de los campamentos, las medidas de lucha contra los vectores y la educación sanitaria han sido elementos estrechamente vigilados por la autoridad sanitaria militar. El objetivo del trabajo fue realizar un estudio de los flebotomos en la zona, en particular de *P. perniciosus*.

La detección de la enfermedad entre los soldados expatriados con motivo de operaciones internacionales se imputa, en primera instancia, a la situación epidemiológica de las áreas en las que se han desplegado. Sin embargo, las condiciones epidemiológicas en territorio nacional, las circunstancias y lugares en los que se realizan las actividades de entrenamiento, y la presencia de abundantes colonias de posibles reservorios, hacen sospechar que los contagios pueden tener lugar también como consecuencia del contacto con los vectores infectados en los campos de adiestramiento, pero que la infección se atribuya a la participación en operaciones internacionales por ser, a primera vista, la opción más plausible. En este sentido, es importante mencionar que las rigurosas medidas de sanidad ambiental llevadas a cabo en las zonas y enclaves de despliegue de las tropas dificultan considerablemente el contacto con los vectores.

En este contexto se plantea, en primer lugar, investigar la presencia de *Leishmania* entre los vectores presentes en uno de los campos de adiestramiento más comúnmente utilizados por las Fuerzas Armadas españolas, el Campo de Tiro y Maniobras (CTM) de Renedo-Cabezón y la Base Militar El Empecinado. Este trabajo tuvo como objetivo realizar un estudio entomológico con el fin de obtener información de las densidades de los flebotomos durante el estío, y las tasas de infección de *Leishmania* en una zona de intensa presencia de posibles reservorios salvajes y con una exposición intensa del personal militar.

## Métodos

### Área geográfica

Las prospecciones entomológicas se realizaron en cuatro zonas militares identificadas como CTM Norte (41.43.19 N, 4.37.55W; a 715 m sobre el nivel del mar), CTM Sur (41.39.41 N, 4.38.13W; 719 m), Base Norte (41.42.11 N, 4.39.57 W; 704 m) y Base Sur (41.42.05 N, 4.39.34 W; 710 m). En su conjunto la zona militar comprende un total de 44,4 Km<sup>2</sup>, rodeada por los municipios de Cabezón de Pisuerga, Santovenia de Pisuerga, Renedo de Esgueva y Castronuevo de Esgueva, a 8 km al noroeste de Valladolid, en una zona de meseta elevada entre los cauces de los ríos Pisuerga al Oeste y Esgueva al Sureste. (Ilustración 7).

La topografía de las áreas de muestreo contiene modestas variaciones de altitud, con una altitud promedio de 710 m sobre el nivel del mar. En un radio de 15 km contiene solamente variaciones de 140 m, y en un radio de 80 km contiene variaciones de hasta 680 m. Las áreas cercanas a los puntos de muestreo están cubiertas por cultivos en cerca del 80% de la superficie y superficies artificiales algo por encima del 10%. Dentro del propio campo de maniobras la superficie arbolada supera el 15% (GMAO, 2015).

Por lo que se refiere a los parámetros climáticos del área de muestreo, la temporada calurosa dura aproximadamente 3 meses desde el 16 de junio hasta el 15 de septiembre, y la temperatura máxima promedio diaria es de 25 °C. El mes más cálido es julio (temperatura máxima promedio de 29 °C y mínima de 14 °C). En general, los veranos son cortos, calurosos, secos y, mayormente, despejados; los inviernos son muy fríos y parcialmente nublados. En el transcurso del año la temperatura generalmente varía entre 1 y 30 °C, y rara vez desciende por debajo de -4 °C o sube por encima de los 35 °C.



El porcentaje promedio de cielo cubierto varía considerablemente a lo largo del año. La época más despejada coincide con la más calurosa ya mencionada. La época más nublada se corresponde con el resto del año. La probabilidad de días con precipitaciones de al menos 1 mm varía a lo largo del año. La temporada más seca se corresponde con la más calurosa. El mes con menos precipitaciones es agosto (2,2 días con al menos 1 mm de precipitación). El periodo del año sin lluvia dura un mes y medio (del 10 de julio al 25 de agosto). El día más largo del año es el 21 de junio con 15:12 h de luz natural. Con respecto al viento, aunque éste depende en gran medida de la topografía y de otros factores, tiene variaciones leves a lo largo del año. La época más ventosa dura 5 meses (del 1 de diciembre al 6 de mayo) con velocidades promedio de más de 14,4 km/h. El mes más ventoso es marzo con vientos promedio de 14,5 km/h. El tiempo más calmado del año dura aproximadamente 7 meses del 6 de mayo al 1 de diciembre y el mes más calmado es agosto (12,8 km/h). La dirección predominante varía a lo largo del año, siendo predominante de componente Este (dura apenas 2 semanas en la segunda mitad de julio) mientras que el viento más frecuente es el de componente Oeste durante casi el resto del año.

Se realizó una observación minuciosa del campo previa a decidir las zonas de muestreo. Se tomaron en consideración los siguientes criterios: la presencia y el número de madrigueras y la presencia de conejos, las condiciones propicias para la presencia y mantenimiento de los vectores, y ser zonas frecuentadas en las actividades habituales del personal de la base o de los efectivos que realizan ejercicios u obras de mantenimiento y mejora del campo. Una vez delimitadas e identificadas las aéreas de muestreo, las trampas fueron movidas de emplazamiento cada noche dentro de la misma área. A continuación, se concretó el intervalo temporal durante el cual se van a realizar los muestreos, tomando como horquilla temporal los meses de verano, en particular desde el último tercio del mes de junio al último tercio del mes de septiembre, por tratarse este periodo del de mayor actividad de los vectores y, por lo tanto, el período durante el cual la posibilidad de recolectar un mayor número de especímenes es más alta. Se dispone que la colocación de la trampa en diferentes áreas de muestreo elegidas sea lo más uniforme posible. Por otro lado, se tiene en cuenta que la limitación más importante para los muestreos será la climatología, ya que tanto la lluvia como el viento intenso no permitirán realizar los muestreos.



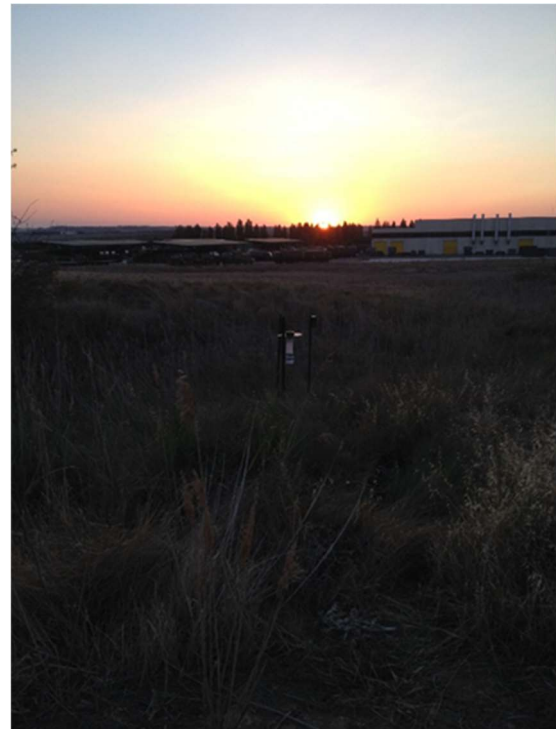
Ilustración 7. (de Izq. a Dch. de arriba a abajo). Puntos de muestreo: Base El Empecinado Norte y Sur, CTM Sur y CTM Norte. Google.

#### Captura e identificación de flebotomos.

Los flebotomos se capturaron durante el verano de 2017, entre los días 25 de junio y 30 de septiembre, en su temporada activa. A la hora de decidir el procedimiento y el equipo de captura se eligieron las trampas CDC miniatura (LT) con luz incandescente debido a los datos publicados acerca de su eficacia frente a otros tipos de trampas o dispositivos (Hesam-Mohammadi et al., 2014). Asimismo, se desechó la idea de utilizar trampas adhesivas colocadas en el suelo por la abundancia de fauna salvaje en las zonas de muestreo. Las trampas de luz se utilizaron durante 68 noches, reemplazándose cada mañana. La temperatura y la humedad relativa (HR) se registraron cada noche mediante registradores de datos (Termohigrómetro Testo 608-H1) colocados en las trampas de luz. Se ideó un dispositivo a modo de trípode que suspende la trampa y sostiene la batería (Ilustraciones 8 y 9); la entrada de la trampa se sitúa a una altura de 1,20 m sobre el suelo (en zonas llanas sin accidentes orográficos, ni edificaciones ni vegetación, y sobre las entradas de las madrigueras) permitiendo que el insecto localice la fuente lumínica.



*Ilustración 8. Trampa CDC (LT) en: CMT Norte y en Base Norte, sobre zonas con abundantes huras de Conejos.*



*Ilustración 9. Trampa CDC (LT) al orto en Base Sur y al orto en CMT Sur.*

Los artrópodos recolectados se trasladaron inmediatamente al laboratorio, siendo sometidos a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  durante unos instantes y, posteriormente, fueron separados y seleccionados. Los flebotomos se almacenaron en etanol al 70% a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. La identificación taxonómica de los flebotomos capturados se basó en la morfología de los genitales masculinos y las espermatecas de las hembras (Gil-Collado, J., Márquez, F. M., & Marín, 1989). Los genitales femeninos se aclararon en medio de Marc-André y se transfirieron junto con la cabeza a una gota de medio de montaje de



Hoyer en un portaobjetos de vidrio para su identificación al microscopio (Molina et al., 2017).(Ilustración 10). Los flebotomos hembra y machos se almacenaron por separado y se diseccionaron posteriormente. La presencia de sangre procedente de una ingestión por picadura previa se determinó por observación bajo un microscopio estereoscópico (Motic™ Estereomicroscopio trinocular BA310E, Fisher Scientific).

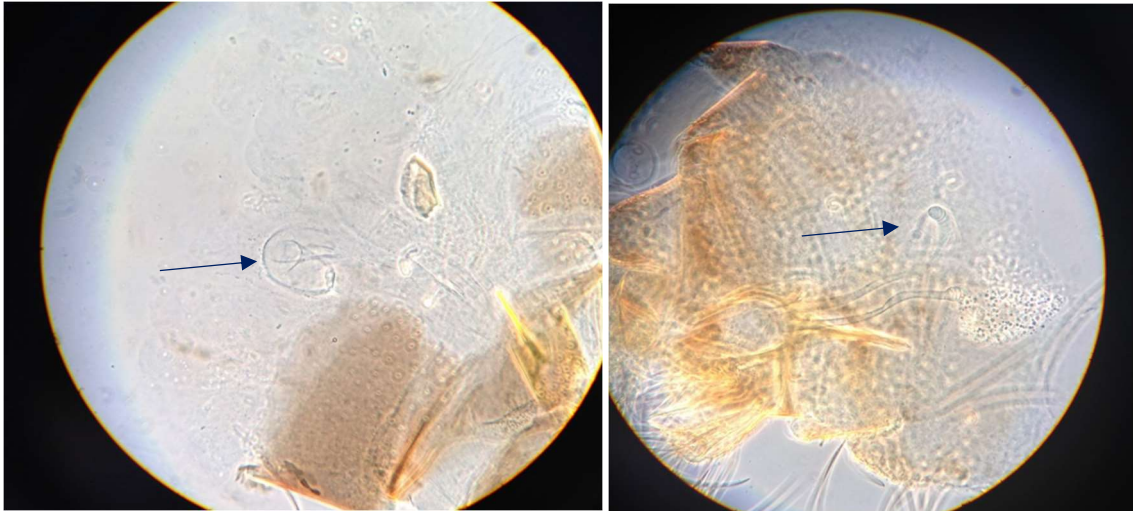


Ilustración 10. Espermatecas de especímenes de *Sergentomya* spp. (Izq), y de *Phlebotomu perniciosus* (Dch), montados sobre Hoyer

#### Extracción de ADN y análisis de PCR

Los flebotomos hembras conservados en etanol al 70% se lavaron individualmente en agua destilada estéril en placas de microtitulación ELISA. Se extrajeron la cabeza, las alas, la genitalia y las patas de cada flebotomo hembra. El tórax y el abdomen se usaron para la extracción de ADN usando el kit de extracción de sangre y tejido DNeasy® (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN de cultivos de promastigotes (control positivo) se obtuvo utilizando el mismo kit. En ambos casos, se obtuvieron dos eluciones de ADN de 100 µl y se determinaron la cuantificación y la pureza adicionales mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). Finalmente, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La detección de *Leishmania* se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento de ADNk de 120 pb, Sequence FkDNA (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') y Sequence RkDNA (5'-GTG GGG GAG CGT TCT-3'). Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa al 1,5 % (Conda S.A., Torrejón de Ardoz, España). Teñidos

posteriormente con solución de Red Safe (30 minutos en agitación, oscuridad y temperatura ambiente) y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio del Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, Valladolid.

## Resultados y Discusión.

Se recolectó un total de 1.829 flebotomos a lo largo de 68 noches de muestreo (media de 26,90 ejemplares/noche). La distribución de capturas según fechas fue la siguiente: 7 en junio, 55 en julio, 30 en agosto y 33 en septiembre. En cuanto a las zonas de muestreo, la distribución fue la siguiente: CTM Norte (n=48), CTM Sur (n=21), Base Norte (n=34), y Base Sur (n=22).

De las 1.829 capturas, se identificaron 203 ejemplares de *P. perniciosus* (11,10%); de ellos, 125 fueron identificados como hembras (61,58%). El 14,40% (14 ejemplares) de las hembras mostraban evidencia de haberse alimentado con sangre en los últimos días.

Los 125 flebotomos identificados como *P. perniciosus* hembras fueron analizados, no detectándose ninguna identificación positiva a la presencia de ADN de *Leishmania*.

La humedad relativa y la temperatura de este estudio corresponden a los valores registrados entre el anochecer y el amanecer, en el momento de colocación y puesta en funcionamiento de las trampas, y de la parada y recolección de los ejemplares atrapados. Los parámetros bioclimáticos recogidos en este trabajo exhibieron fluctuaciones ligeras a lo largo de todo el periodo de estudio (Ilustraciones 11 y 12).

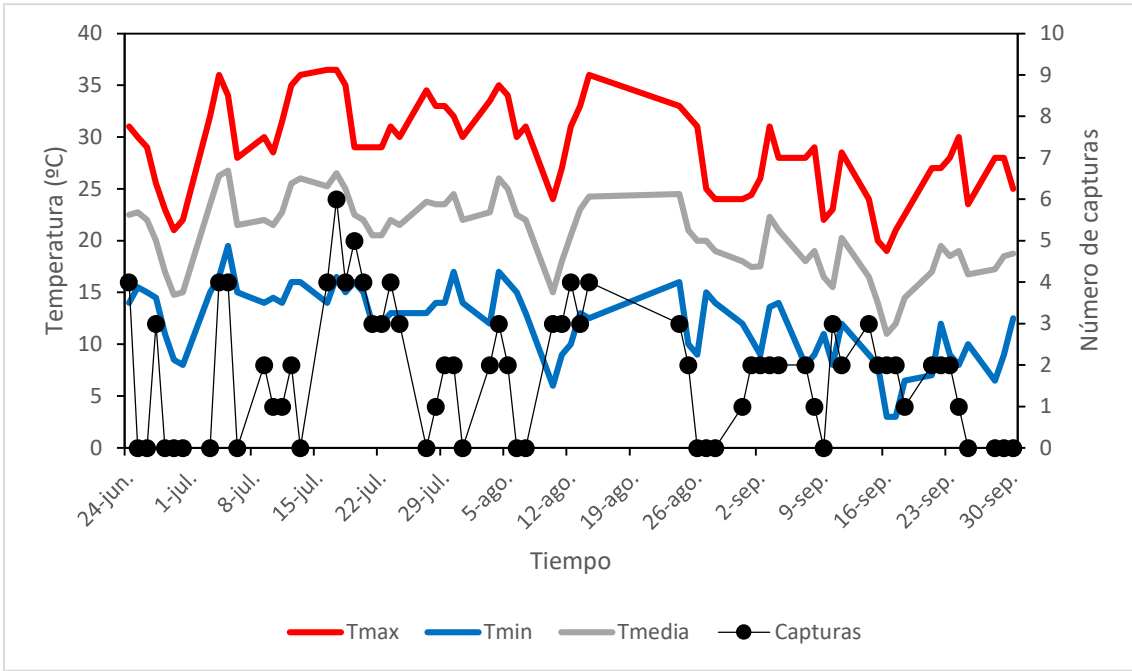


Ilustración 11. Temperaturas máximas, mínimas y medias durante el tiempo de capturas. Se incluye el número de capturas por noche

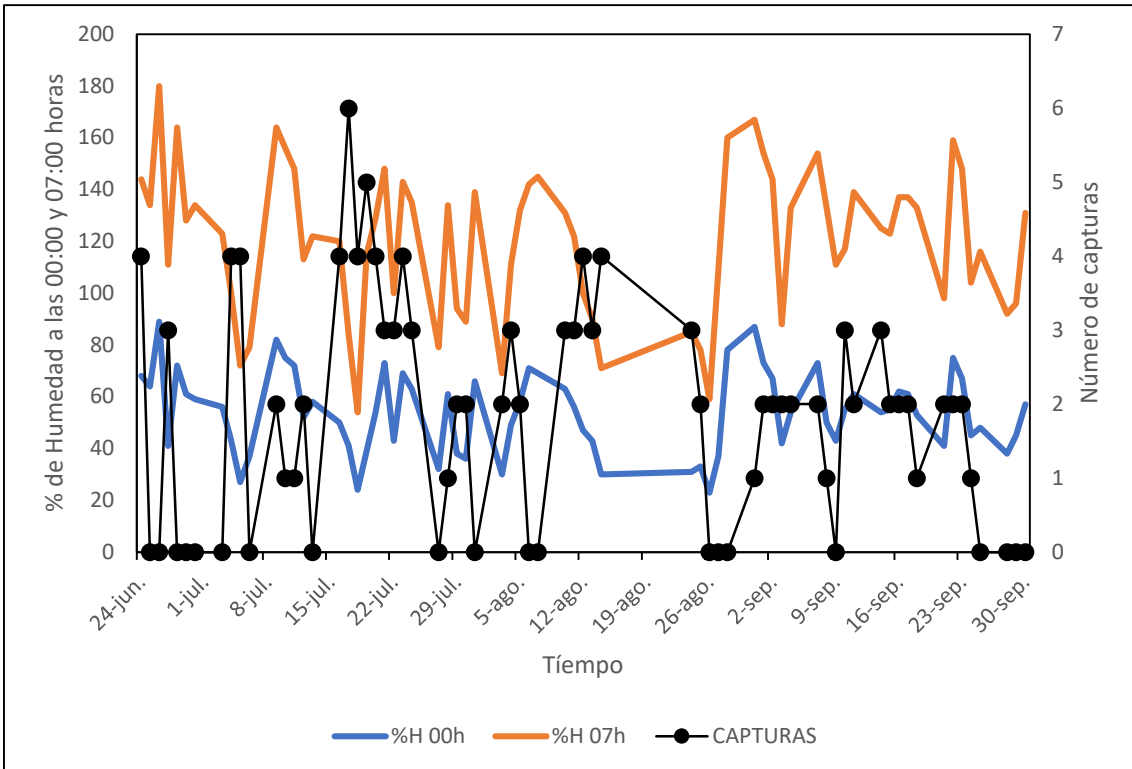


Ilustración 12. Porcentajes de Humedad a las 00:00 h y a las 07:00 h en la zona de muestreo. Se incluye el número de capturas por noche

Los estudios de prevalencia de la infección por *Leishmania* en los vectores flebotomos indican la intensidad de la transmisión por parte del parásito (Burkett, Knight, Dennett, Sherwood, Rowton, & Coleman, 2007; E. González et al., 2017; Muñoz et al., 2017; Torina, Sole, Reale, Vitale, & Caracappa, 2008). En este trabajo se pretende obtener información sobre las tasas de infección por flebotomo y el grado de exposición humana a la leishmaniosis en un área muy concreta donde se realizan actividades de instrucción militar. En España, se detectó un aumento inusual de los casos de leishmaniosis humana en Madrid (E. González et al., 2017); los estudios entomológicos mostraron la importancia de *Phlebotomus perniciosus* como vector. Por su parte, Torina et al. (Torina et al., 2008) analizaron un total de 194 hembras para *L. infantum* mediante análisis de PCR, encontrando unas determinaciones positivas (9,8% de hembras grávidas, 5,8% de hembras alimentadas con sangre, y 5,5% de hembras sin evidencia de alimentación con sangre) que apoyan el uso de las moscas de arena para la evaluación de la prevalencia de *Leishmania*. Por el contrario, no se encontró ninguna identificación positiva en el presente estudio.

La presencia de leishmaniosis en algunas zonas puede estar asociada con la urbanización, factores ecológicos y cambios climáticos o cambios antropogénicos de la tierra, como la deforestación-reforestación o la construcción de carreteras, que provocan cambios en las densidades de vectores y de los hospedadores, o variaciones en las especies que pueden participar como tales (Alten et al., 2016). Así, estos autores observaron la expansión geográfica de vectores flebotomos de *L. infantum* en el Mediterráneo debido a cambios en el clima. Por su parte, diversos autores han evidenciado los cambios en la distribución espacial de los vectores debido a influencias tanto climáticas como socio económicas (Ballart et al., 2014; Fischer et al., 2011; Franklins et al., 2019; Gálvez, Descalzo, Guerrero, Miró, & Molina, 2011; McIntyre, Rangel, Ready, & Carvalho, 2017; Valero & Uriarte, 2020). Estas circunstancias pueden ser un importante elemento facilitador de los brotes de ETV. En el caso del presente estudio, las altas densidades de conejos unido a la presencia del vector resultan preocupantes. Aunque la leishmaniosis es considerada una enfermedad zoonótica en España, con el perro como principal reservorio, los lagomorfos parecen jugar un papel como reservorios salvajes de leishmaniosis (Jiménez et al., 2014; R. Molina et al., 2012b).

Con respecto al personal militar, ciertos autores estudiaron la distribución temporal y geográfica de las moscas de arena en la base militar estadounidense de Tallil,

Irak (Coleman et al., 2007), encontrando que el número de moscas fue pequeño en Abril, aumentó a lo largo de Mayo, y se mantuvo en sus cifras más altas desde mediados de Junio hasta principios de Septiembre para, posteriormente, disminuir rápidamente a finales de Septiembre y Octubre. Estos autores también publicaron que las moscas eran más más activas a primeras horas de la tarde durante los meses más frescos, mientras que lo eran en mitad de la noche durante los meses más calurosos. Por otro lado, otros autores estudiaron el impacto del tiempo atmosférico sobre la actividad de la mosca de arena (Colacicco-Mayhugh et al., 2011), encontrando que la velocidad del viento, el porcentaje de cielo cubierto, y la iluminación de la luna tienen una influencia negativa sobre el número de moscas; de esta forma, estos autores establecieron que había un mayor número de moscas las noches cálidas, claras, con poco viento y mínima iluminación lunar. El impacto de las condiciones climáticas sobre el muestreo no resultó de especial interés para las conclusiones de este estudio. Sin embargo, es importante tomarlas en consideración a la hora de planificar y ejecutar dicho plan de muestreo para obtener un resultado óptimo en forma de especímenes capturados. En principio, la zona de muestreo no se puede considerar como una zona de presencia de *L. infantum* y, en consecuencia, de riesgo de transmisión. Consecuentemente, no se trata de una zona en la que se deba efectuar una vigilancia intensiva y continua para regular las poblaciones de lagomorfos y las densidades de los flebotomos vectores. No obstante, los datos acerca de los vectores y su distribución deben actualizarse periódicamente y mantener sistemas de vigilancia de las poblaciones de flebotomos vectores, así como la presencia del parásito en los flebotomos y en los posibles reservorios silvestres como los lepóridos.

Las actividades de instrucción y adiestramiento presentan unas particularidades que hacen que el personal militar se encuentre particularmente expuesto al contagio por *Leishmania*. En primer lugar, se realizan al aire libre en terrenos de dedicación exclusiva para este fin, con la consideración a tener en cuenta de que en estas áreas no se realizan otras actividades, como las cinegéticas o la explotación ganadera. La existencia o abundancia de fauna silvestre es considerable y puede ser un elemento adicional que garantice el mantenimiento de un ciclo selvático con gran facilidad. En segundo lugar, muchas de las actividades militares se llevan a cabo durante la noche, y con más intensidad en los periodos del orto y el ocaso en período estival; estos parámetros coinciden con los de mayor actividad del vector, lo que se traduce en una mayor exposición. En tercer lugar, las medidas preventivas de carácter personal, que con suma



atención se aplican en el transcurso de las operaciones y misiones internacionales, no son observadas con idéntica intensidad en el territorio nacional por tener una percepción de mayor seguridad.

En virtud de lo anteriormente expuesto y, como consecuencia, por un lado, de la presencia del vector y, por otro, de la abundancia de un reservorio, resultaba imperativo descartar la posibilidad de la existencia de un ciclo selvático estable y, por tanto, de una exposición importante del personal militar que frecuenta las instalaciones, habida cuenta de que se habían notificado casos en este personal, si bien en la mayoría de los casos con una relación directa con la participación en operaciones fuera de España (Comunicación Personal, Sanidad Militar).

Otro elemento que considerar es la utilidad de aportar experiencias para establecer unas pautas de monitorización de las ETV que nos permitan establecer protocolos que sean representativos en el territorio nacional, y, de forma especial, en operaciones y misiones internacionales sobre el terreno en áreas de especial prevalencia de este tipo de enfermedades. En este sentido, se extraen conclusiones relacionadas con las condiciones de los muestreos, identificación de los hábitats y zonas de especial peligro y control de los vectores y reservorios, así como de la aplicación y evaluación de todas las medidas preventivas y el establecimiento de procedimientos de educación sanitaria. Es, por tanto, una fuente importante de datos para ser utilizados en las tareas de inteligencia sanitaria.

Al objeto de este estudio no se ha podido constatar la presencia del *Leishmania* en ninguno de los especímenes capturados durante la campaña llevada a cabo en el transcurso del verano de 2017 en las áreas definidas para el muestreo en las instalaciones de la Base Militar El Empecinado y del Campo de Tiro y Maniobras de Renedo-Cabezón, por lo que se estima que, a pesar de la abundancia de reservorios leporidos y de la presencia del vector, el riesgo de transmisión de la leishmaniosis a los soldados que utilizan las instalaciones es extremadamente bajo.

La realización de estudios de monitorización de vectores y determinación molecular de la presencia de agentes infecciosos o parasitarios son extremadamente útiles para proteger a las tropas de contagios y/o brotes de ETV. Los estudios realizados en las instalaciones militares en territorio nacional tienen una extraordinaria utilidad para detectar variaciones en la presencia de las ETV, y constituyen una potente herramienta que sirve de alerta temprana en el caso de las enfermedades emergentes y reemergentes.

Sin embargo, su mayor utilidad se centra en aportar información esencial para la protección de los efectivos y para la implantación de planes de control y sistemas de verificación de éstos con ocasión de los desplazamientos a zonas en situaciones sanitarias deprimidas o altamente endémicas en ETV.



# DetECCIÓN MOLECULAR DE *Leishmania* EN SOLDADOS DESPLAZADOS EN MISIONES INTERNACIONALES.

---

## Introducción

En los últimos treinta años, con ocasión de los conflictos acaecidos en Oriente Medio, Golfo Pérsico y Afganistán, se ha desplazado un número importante de civiles y militares occidentales a un área con intensa presencia de leishmaniosis. Este personal se ha visto expuesto durante periodos más o menos prolongados al contacto con el vector y, en consecuencia, en riesgo de contagio. (Ilustración 13). Los acondicionamientos de los campamentos, las medidas de lucha contra los vectores y la educación sanitaria han sido elementos estrechamente vigilados por la autoridad sanitaria militar.

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria producida por protozoos del género *Leishmania* (Bañuls et al., 2007) y transmitida por dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Lewis, 1982) que afecta a más de 350 millones de personas por todo el mundo (Alvar, Vélez, Bern, Herrero, Desjeux, Cano, Jannin, & Boer, 2012; OMS, 2017a).

La enfermedad puede presentarse de muy diferentes formas (Herwaldt, 1999) dependiendo de la especie de parásito y de las características del hospedador (Gupta, Oghumu, & Satoskar, 2013), entre las que los factores inmunitarios juegan un papel de primer orden ya que puede dotarle de protección frente al agente y facilitar un cuadro benigno con curación espontánea o, por el contrario, agravar los cuadros hasta producir la muerte (Maspi, Abdoli, & Ghaffarifar, 2016). Se habla de forma tradicional de las formas visceral, cutánea y mucocutánea de la enfermedad; sin embargo, con frecuencia se describen las formas complejas relacionadas con la evolución de las anteriores: cutánea difusa, cutánea diseminada, dérmica post-kala-azar y las complejas manifestaciones de las coinfecciones con VIH (Sakkas, Gartzonika, & Levidiotou, 2016).

La epidemiología de la enfermedad se torna cada vez más compleja conforme avanza el conocimiento sobre ella. Si tradicionalmente se ha considerado la leishmaniosis

como una de las enfermedades zoonóticas de transmisión vectorial más paradigmáticas, sus ciclos coexisten con otros exclusivamente antroponóticos donde el agente se mantiene sin la participación directa de reservorios no humanos (Michele Maroli et al., 2008), si bien los animales intervienen manteniendo poblaciones significativas de vectores en el entorno humano. También se describen formas de transmisión sexual y vertical (Turchetti et al., 2014).



*Ilustración 13. Lesiones cutáneas en un soldado español con LC tras su regreso de Afganistán.*

El objetivo del trabajo es establecer la posibilidad de contraer la enfermedad, en primer lugar, tras una exposición en una zona altamente endémica durante un periodo relativamente prolongado de un grupo homogéneo de soldados en el desarrollo de una misión militar internacional; en segundo lugar, comprobarlo tanto en misiones anteriores en zonas endémicas o por la realización de ejercicios en áreas militares donde el parásito se encuentra presente; y, finalmente, si la convivencia cotidiana con posibles reservorios en zonas endémicas en territorio nacional puede condicionar el contacto con el parásito.

El estudio cuenta con la aprobación del comité ético de investigación clínica del área de salud de Valladolid-Este, que en su reunión del 13 de julio de 2017 procedió a la evaluación de los aspectos éticos del proyecto. Así mismo todos los participantes en el estudio han procedido a realizar el consentimiento informado para la investigación clínica.

## Material y Métodos

### Soldados

Para este estudio se utiliza una población de 50 soldados desplazados a Irak durante seis meses, entre septiembre de 2017 y febrero de 2018, integrados en el contingente Apoyo a Irak VII en la Base “Gran Capitán”, en Besmayah (Irak) (33.11.23N - 44.36.58E) a 31 m s.n.m. (metros sobre el nivel del mar). Los soldados proceden de diferentes acuartelamientos de España y, en su mayoría, han participado con anterioridad en otras misiones internacionales. Durante la misión realizan actividades fundamentalmente fuera de la base en tareas de obra pública (acondicionamiento de caminos y carreteras, y mejoras de infraestructuras en general), y también en el interior de la base y destacamentos para la mejora de la calidad de las infraestructuras en las zonas de vida de las tropas. Su despliegue se prolongó durante un mínimo de seis meses, durante los cuales las actividades de los soldados implicaban, ineludiblemente, actividades fuera de la base y durante periodos que, en numerosas ocasiones, se extendían más allá del ocaso pernoctando al aire libre.

### Climatología

Se trata de una zona en la que los veranos son tórridos, áridos y despejados, y los inviernos son fríos, secos y despejados (GMAO, 2015); a lo largo del año la temperatura varía entre los 5 y los 45°C, y rara vez baja de 1°C o sube por encima de los 48°C. La

temporada más calurosa dura aproximadamente 4 meses desde finales de mayo hasta finales de septiembre, con una temperatura máxima promedio diario de más de 39°C. El mes más cálido es julio con una temperatura máxima en torno a los 40° C y una mínima de 28°C. La temporada menos cálida dura aproximadamente 3,5 meses desde el 23 de noviembre al 5 de marzo, con una temperatura máxima menor de 22°C; el mes más frío es el de enero con una temperatura mínima de 5°C y una máxima de 16°C. El porcentaje de cielo cubierto en la región varía considerablemente a lo largo del año, siendo la época más despejada la que transcurre entre finales de mayo hasta mediados de octubre (aproximadamente 5 meses). Durante el mes de julio el cielo está despejado durante el 100% del tiempo. La época más nublada comienza aproximadamente a mediados de octubre con una duración de 7,5 meses terminando a finales de mayo; el mes más nublado es el de diciembre, durante el cual el promedio de cielo nublado es del 34%.

Las precipitaciones varían a lo largo del año y la temporada más húmeda dura aproximadamente medio año desde mediados o finales de octubre hasta mediados de mayo, con una probabilidad de precipitación en torno al 7%; el mes con más precipitaciones es el de enero con un promedio de 4,2 días con precipitaciones superiores a 1 mm. La temporada seca dura 5,5 meses desde mediados de mayo hasta finales de octubre, con un promedio de precipitación en torno a cero días en julio. A diferencia de la temperatura, que varía considerablemente entre la noche y el día, la humedad relativa permanece constante en torno al 1%. La velocidad promedio del viento tiene variaciones estacionales considerables a lo largo del año. La época más ventosa dura aproximadamente 3,5 meses desde el 27 de mayo al 3 de septiembre, con velocidades promedio de más de 13,5 km/h. En esta región el mes más ventoso es el de julio (promedio de 16 km/h). El periodo con el viento más calmado dura 8,5 meses (de septiembre a mayo), siendo diciembre el mes más calmado (promedio de 10 km/h). La dirección predominante del viento varía a lo largo del año. El viento de componente Oeste es el más frecuente desde finales de junio a principios de agosto, y durante el resto del año el viento más frecuente es el de componente Norte.

La duración del día en la región varía considerablemente a lo largo del año. El día más corto es el 22 de diciembre con 9:57 h de luz natural y el día más largo es el 21 de junio con 14:22 h de luz natural. La salida del Sol más temprana es a las 4:52 h el 12 de junio, y la más tardía a las 7:06 h del 8 de enero. La puesta de Sol más temprana es a las 16:54 h del 4 de diciembre, y la más tardía a las 19:15 h del 29 de junio.

En los entornos cercanos a la base, la topografía presenta variaciones de altitud modestas (31 m s.n.m.). En un radio de 15 km siguen manteniéndose ligeras variaciones de la altitud (47 m s.n.m.). En un entorno más amplio, hasta los 100 km, estas variaciones sólo aumentan hasta los 77 m s.n.m.

En los entornos más próximos a la base, el suelo está cubierto casi en su totalidad de superficies artificiales. En un radio más amplio (hasta los 80 km), aumentan las superficies de cultivo hasta más de un 50%, y la tierra virgen oscila en torno al 25%.

## Muestras

Las muestras de pelo y suero se obtuvieron a partir de cada individuo el día inmediatamente anterior al comienzo de la misión, así como el día inmediatamente posterior a su regreso. Mediante el uso de tijeras, se cortaron 15-20 pelos de cada soldado, se introdujeron en bolsas de plástico estériles y se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 h hasta su análisis.

Las muestras de suero fueron obtenidas tras la extracción de sangre utilizando tubos BD Vacutainer® SST™ II Advance. Se permitió que la sangre coagulara durante 15-30 min a temperatura ambiente, y se centrifugó a 2000 g durante 10 min. Los sobrenadantes fueron transferidos inmediatamente a tubos de polipropileno y se almacenaron a 4°C durante 24 h hasta su análisis.

## Extracción del DNA y análisis qPCR de las muestras de pelo

Alrededor de 20 pelos de cada soldado se introdujeron en microtubos estériles de tapón roscado conteniendo 250 µl de tampón de lisis (10 mM TrisCl, 0,1 M EDTA, 0,5% SDS) con 100 mg/ml de Proteinasa K. Se incubaron durante la noche a 56°C. El DNA fue extraído utilizando 200 µl de sobrenadante obtenido a partir de las muestras procesadas y el GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La técnica de la qPCR utilizada en este trabajo se llevó a cabo siguiendo los protocolos publicados previamente (Belinchón-Lorenzo et al., 2016). Brevemente, las reacciones de la PCR se realizaron en placas de micro título de 96 celdas en un volumen final de 20 µl (4 µl de DNA + 16 µl de Reaction Mix), conteniendo 20 µM de cada primer (Leish 1: 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' y Leish2: 5'-



ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), 10  $\mu$ M de TaqMan Probe (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB), y el iTaq Universal Probes Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los ciclos térmicos utilizados fueron una incubación a 50°C durante 2 min y una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguidos por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s y un anillado y extensión a 60°C durante 1 min. Cada amplificación contuvo controles positivos y negativos. El DNA extraído a partir de 55,000 promastigotes de *L. infantum* MCAN/ES/1996/BCN150 zymodeme MON-1 se utilizó como control positivo. El DNA extraído a partir de muestras de sangre de perro sano se utilizó como control negativo. Todos los análisis se llevaron a cabo en un Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems Laboratories, Foster City, CA, USA). Para la cuantificación de *Leishmania* kDNA, se elaboró una curva estándar utilizando DNA extraído de 6 cantidades diferentes de parásitos de *L. infantum* (MCAN/ES/1996/BCN150, zimodema MON-1) desde 50,000 a 0,5 (factor de dilución x10); el DNA se extrajo y se analizó junto con las muestras de pelo por triplicado. El límite del ciclo (Ct) correspondiente al Y-intercepto de cada análisis (es decir, el valor de Ct esperado para la cantidad estimada de 1 parásito) se usó como punto de corte, siendo positivas aquellas muestras cuyo valor Ct fuese  $\leq$  Y-intercepto de cada análisis. Los análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio LeishmanCeres, Unidad de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

#### Immunoensayo quimioluminiscente de las muestras de suero

Se utilizó *Leishmania* VirClia® IgG+IgM Monotest (VirCell, Granada, España) como test de anticuerpos contra *Leishmania infantum* en las muestras de sueros. El formato del mono test contiene reactivos listos para su uso con un protocolo automatizado utilizando el instrumento y el software VirClia®. Se siguieron las instrucciones del fabricante y trabajos previos (Cubero et al., 2018). Los análisis fueron llevados a cabo por el Servicio de Microbiología e Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid. (Ilustración 14).



Ilustración 14. (Izq.) Muestras de suero de Soldados en descongelación y (Dch), equipo de ensayo serológico por bioluminiscencia

## Resultados y Discusión

Se ha tratado de constatar la exposición al parásito y la posibilidad de contagio de la enfermedad en un contingente homogéneo desplazado a Irak durante 6 meses. Para ello, se han estudiado muestras por análisis molecular e inmunológico obtenidas mediante procedimientos invasivos (suero) y no invasivos (pelo), tanto con anterioridad al despliegue como inmediatamente después del regreso de la zona de operaciones.

El grupo que compone la muestra consta de 50 soldados con una antigüedad media de servicio en el ejército de 12,96 años, con un mínimo de 1 año hasta un máximo de 26. Tienen en común un buen estado de salud y unas óptimas condiciones físicas. A partir de este signo común existe variación con respecto a la edad, abarcando una horquilla que va desde los 23 a los 49 años con una media de 34 años. Con respecto al género, el grupo consta de 6 mujeres y 44 varones. No todos ellos han participado en misiones internacionales con anterioridad; el número de participaciones va desde ninguna hasta un máximo de 6. Algunos de ellos viven en territorio nacional en viviendas unifamiliares de áreas periurbanas (8; 16%) o en viviendas aisladas (1; 2%); el 76% (38 soldados) vive en centros urbanos; 3 (6%) de ellos no especificaron su tipo de vivienda. En cuanto al contacto con mascotas, 19 (38%) de los participantes declararon poseer y convivir con ellas, 28 (56%) no, y 3 (6%) no respondieron. Del total de 19 soldados que tiene mascotas, el 37,3% son perros. Dos de los soldados presentaron con anterioridad procesos con clínica compatible con la enfermedad (Comunicación Personal, Sanidad Militar). El primero es un varón de 33 años que con anterioridad participó en 6 misiones (3 en Irak y 3 en Afganistán), y el segundo es otro varón también de 33 años que participó en 2 misiones en Afganistán.

Ninguna de las muestras analizadas (pelo y suero) resultó positiva, ni las tomadas con anterioridad al despliegue ni las obtenidas inmediatamente después del regreso.

Los resultados ponen de manifiesto el hecho de que no se ha producido ningún contacto con el parásito en el transcurso de la misión de 6 meses en Irak. Así mismo, constata que no ha habido ninguna exposición previa de los sujetos al agente con anterioridad al despliegue, tanto con ocasión de la participación en anteriores misiones, como por la exposición en territorio nacional en ejercicios o maniobras militares, o por la posibilidad de contagio a partir de los propios animales domésticos.

A pesar de la alta exposición a los vectores y de la elevada prevalencia del parásito en la zona en la que se han desarrollado las actividades del grupo, no ha aparecido ningún contagio, por lo que las medidas preventivas ordenadas por la sanidad militar han sido aplicadas con eficacia. Las medidas recomendadas por la autoridad sanitaria militar (Coleman, Burkett, Putnam, Sherwood, Caci, Jennings, Hochberg, Spradling, Rowton, Blount, Ploch, Hopkins, Raymond, O'Guinn, et al., 2006; Krüger, Strüven, Post, & Faulde, 2011) para su aplicación en el transcurso de las operaciones militares en el extranjero abarcan un elenco de medidas pasivas y activas, similares a las que recomiendan otros países de nuestro entorno, donde el control de los vectores y reservorios constituye el elemento más destacado. Uno de los esfuerzos más importantes a la hora de prevenir y controlar la leishmaniosis en personal militar desplazado se llevó a cabo en la base de operaciones estadounidense de Tallil, Irak, en la que se mostró que había un alto número de moscas de arena (60.533 entre Abril y Octubre de 2003; 32.110 entre los mismos meses de 2004), que los soldados recibían numerosas picaduras durante una sola noche (en algunos soldados se registraron más de 1000 picaduras en una sola noche), y que *Leishmania* estaba presente en el 1,5% de las moscas de arena hembras tras realizar un análisis con la técnica de la PCR (Coleman, Burkett, Putnam, Sherwood, Caci, Jennings, Hochberg, Spradling, Rowton, Blount, Ploch, Hopkins, Raymond, O'Guinn, et al., 2006). También la educación sanitaria, la utilización de los repelentes y de barreras físicas como telas mosquiteras impregnadas de insecticidas, han sido cuidadosamente observadas por los contingentes. En este caso, los mismos autores (Coleman, Burkett, Putnam, Sherwood, Caci, Jennings, Hochberg, Spradling, Rowton, Blount, Ploch, Hopkins, Raymond, O'Guinn, et al., 2006) establecieron un sistema de control del parásito. Sin embargo, todas estas medidas no han evitado que ocasionalmente se hayan producido contagios y la enfermedad se haya manifestado clínicamente.

En primer lugar, se aplicaron las medidas de carácter pasivo, esto es, la utilización de repelentes con base en la N,N-Dietil-meta-toluamida (DEET). Muchas de las actividades cotidianas se realizan fuera de las bases y, aunque suelen ser diurnas, en ocasiones se extienden hasta el ocaso, momento de máxima actividad de los vectores. Tampoco es extraño encontrar flebotomos activos en horario vespertino en las zonas más frescas o de reposo, zonas que suelen ser utilizadas frecuentemente para el descanso de los soldados.

Además de las acciones de carácter pasivo hay que tener en cuenta las medidas activas centradas fundamentalmente en la realización de fumigaciones aéreas con insecticidas a base de piretroides, así como las pulverizaciones residuales en las zonas de descanso de los insectos; son medidas determinantes en la reducción del número y actividad del vector. La utilización de otros insecticidas en las zonas de operaciones, como larvicidas y ovicidas, no muestra una eficacia comparable con los anteriores. Estos últimos presentan una gran eficacia en la lucha frente a vectores nematóceros como los anofelinos y los culicinos, cuyas fases larvianas se desarrollan en medios acuáticos; sin embargo, son del todo inútiles para la lucha frente a los flebotomos, cuyas fases larvianas son de desarrollo terrestre y de muy difícil acceso para las aplicaciones de este tipo de productos. Se han evaluado distintos insecticidas para el control de las moscas de arena (Coleman et al., 2011); estos autores estudiaron la eficacia de diferentes insecticidas (carbaril y lambda-cihalotrin, piretrinas, deltrametrin) aplicados alrededor de las tiendas y en las casas, encontrando que en ningún caso se consiguió eliminar por completo a las moscas o disminuir su número durante un período de tiempo continuado.

El control de los reservorios en las zonas próximas a las bases es de gran importancia para evitar la primo infestación de los vectores. No obstante, debe tenerse en cuenta que, fuera del entorno más próximo a la base, deambulan animales sin control que son los que mantienen el ciclo. En puntos más alejados de las bases de operaciones este factor se multiplica, y a los soldados sólo les confiere protección la advertencia de los riesgos que implica la relación con estos animales.

Las barreras físicas juegan un papel importante en estas áreas para evitar el acceso de los hospedares a los humanos. Así, las telas mosquiteras impregnadas o no de insecticidas piretroides con una luz de malla de 4 mm<sup>2</sup> confiere una protección eficaz durante la noche.

Las actividades que se realizan en el marco de la instrucción y adiestramiento de las unidades en territorio nacional se llevan a cabo en los campos de maniobras distribuidos por todo el territorio. A pesar de que se tiene constancia de la existencia del ciclo epidemiológico de la enfermedad y de que las actividades mencionadas entrañan una exposición adicional, no se ha evidenciado ningún contagio. En el caso del contingente objeto del estudio, estas actividades se realizan fundamentalmente en los campos de Los Montalvos de Salamanca y de Renedo - Cabezón de Valladolid. Estos ejercicios se realizan al aire libre y en la mayoría de los casos con pernoctaciones al aire libre especialmente en los periodos cálidos y templados que coinciden con los de mayor actividad de los vectores.

Aunque todas las medidas preventivas se han aplicado con más intensidad durante los últimos años, parece que desde hace tiempo se ha venido evitando con eficacia la picadura de las moscas, ya que todos los participantes en el estudio que con anterioridad formaron parte de otros contingentes desplegados en esta o en otras áreas de la región antes citada tampoco han exhibido resultados positivos.

Existe un número de sujetos que vive en áreas periurbanas y/o que tienen mascotas. En ninguno de estos colectivos ha podido apreciarse la presencia de ADN del parásito o una respuesta inmunitaria. Se puede concluir que el seguimiento de las medidas sanitarias recomendadas para la protección de los animales domésticos en general, y, de los perros en especial, es eficaz.

Finalmente, la concordancia de los resultados obtenidos a partir de las técnicas invasivas y no invasivas pone de manifiesto la representatividad de los resultados, tal y como otros autores demostraron con anterioridad en el caso de los animales (Belinchón-Lorenzo et al., 2013). La determinación de la exposición al parásito a partir del pelo del sujeto es una técnica ciertamente novedosa (Belinchón-Lorenzo et al., 2016) que, sin duda, aporta innumerables ventajas frente a técnicas tradicionales, sobre todo cuando se trata, por ejemplo, de cribados en zonas con estructuras sanitarias deficientes o de difícil acceso, como es el caso de los países en vías de desarrollo o en zonas de conflicto. La gestión de las muestras altamente perecederas supone un grave inconveniente. Su conservación hasta el momento de su análisis de forma que se garantice su integridad es, en ocasiones, un problema de difícil solución. Por ello, el uso de muestras de pelo, con resistencia demostrada a lo largo del tiempo a distintos parámetros ambientales (Muñoz-

Madrid et al., 2013), facilita y garantiza unos resultados fiables; estos autores sometieron muestras de pelo a temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 10 meses, a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 4 meses, a la luz ultravioleta en una cabina de flujo laminar durante 72 h, y al tratamiento con sales de curtido de pieles durante 3 días, obteniendo presencia positiva del parásito utilizando la técnica qPCR. El único tratamiento al que no fueron detectados fueron las condiciones de putrefacción, es decir, la exposición de los pelos a contaminación fecal a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 ó 3 días. Esto supone un importante avance en la lucha a nivel global frente a la enfermedad, sobre todo en los países en vías de desarrollo, en los que la dificultad de medios hace inviable la toma, procesado, conservación y transporte de las muestras.

En este marco se han producido en los últimos treinta años graves disturbios en la seguridad mundial que han tenido su epicentro en Oriente Medio, crisis que han supuesto la intervención de un elevado número de tropas y de personal civil pertenecientes a ejércitos multinacionales o a organismos multilaterales u ONGs que se han visto desplegados en estas regiones en las que la presencia de la enfermedad, en casi todas sus variantes, es muy importante (Raymond L. Jacobson, 2011). No se sabe con exactitud el número total de personas perteneciente a estos grupos que han contraído la enfermedad a lo largo de todo este periodo, pero hay estimaciones que indican que varios miles. Algunos gobiernos como el estadounidense aportan datos muy exactos en este sentido con respecto a su personal militar y civiles desplazados (Magill, 2005). En los últimos años, en las Fuerzas Armadas españolas se han detectado algunos casos clínicos (Comunicación Personal, Sanidad Militar), pero no se cuenta con información recogida sistemáticamente que aporte ni siquiera una aproximación al problema. La razón de esta situación puede basarse, por un lado, en que el periodo de incubación puede ser largo, lo que provoca que la aparición de la clínica tenga lugar con posterioridad al regreso de la misión, y en segundo lugar, al hecho de que la labor asistencial en territorio nacional no corresponde a la Sanidad Militar por lo que ésta no puede recopilar datos en este sentido y es posible que a nivel externo no se realicen diagnósticos asertivos si la clínica no es muy manifiesta. A esto debe añadirse que se trata de una enfermedad endémica en nuestro país, de forma que, aún diagnosticada, es posible que no se atribuya a un contagio en el transcurso de una operación fuera de territorio nacional.

La presencia de la enfermedad en España está descrita desde el verano de 1912 cuando Pittaluga diagnosticó en la comarca de Tortosa (Tarragona), el primer caso español de kala-azar, al visualizar leishmanias en una muestra obtenida por punción

esplénica de un enfermo sospechoso (Botet Fregola & Portús Vinyeta, 1993). Desde entonces ha experimentado un aumento perceptible en las últimas décadas como consecuencia de factores ya mencionados. El incremento de la enfermedad en los reservorios caninos (Ribeiro et al., 2018) hace pensar que el número de contagios a humanos ha seguido un ritmo proporcional.

No existen, hasta el momento, datos de la utilización de muestras de pelo humano para la determinación de ADN de *Leishmania*. Existen datos a partir de muestras de pelo de perro (Belinchón-Lorenzo et al., 2013), ratón de laboratorio infestado artificialmente (Iniesta et al., 2013), zorro, garduña, rata, lobo y erizo (Muñoz-Madrid et al., 2013), y conejo (Ayuso-Sáinz et al., 2022). Varios de estos autores han demostrado que las muestras de pelo pueden ser utilizadas para el diagnóstico molecular de tanto *L. infantum* como *L. major*, y que pueden ser empleadas en el estudio de infecciones epidemiológicas, clínicas y experimentales (Belinchón-Lorenzo et al., 2013; Iniesta et al., 2013; Muñoz-Madrid et al., 2013). Por todo ello, resulta de particular interés el presente estudio.

# Conclusiones

---

- Puede resultar evidente a priori asumir que el hecho de participar en ejercicios de adiestramiento y en misiones internacionales por parte de las Fuerzas Armadas es un riesgo adicional para contraer la leishmaniosis. En primer lugar, por la exposición adicional que supone una mayor probabilidad de contacto con el vector y las circunstancias de nocturnidad en la que se realizan las actividades, y en segundo lugar, las actividades tienen lugar generalmente en territorios con unas mayores tasas de prevalencia de las enfermedades de transmisión vectorial en general, y de leishmaniosis en particular, por las propias circunstancias socio-sanitarias de las zonas de despliegue. Habida cuenta de esta premisa, sorprende el bajo rastro del parásito en una muestra del colectivo cuyo grado de exposición es paradigmático. En consecuencia, se puede concluir que la participación en misiones internacionales, en general en zonas con una elevada prevalencia de la enfermedad, no supone un riesgo adicional de contraer la enfermedad.

- El Campo de Tiro y Maniobras de Renedo-Cabezón y la Base El Empecinado reúnen algunas características propicias para realizar un estudio como el presente. Son utilizados por un número muy elevado de efectivos a lo largo de todo el año, cuentan con la presencia de vectores competentes y presentan una elevada densidad de reservorios. Sin embargo, de los resultados obtenidos se desprende que no existe un riesgo adicional de contagio por el uso de estas instalaciones, a pesar de la presencia del parásito en los reservorios. En conclusión, el ciclo se mantiene a duras penas en el ambiente silvestre con una baja contagiosidad para el vector, y, en consecuencia, incluso menor para el ser humano como hospedador incidental.

- Uno de los avances más importantes en la lucha contra la leishmaniosis es la capacidad de realizar una detección precoz de la infección, no solo para instaurar los tratamientos tempranos en los seres humanos enfermos, sino, sobre todo, para interferir en la epidemiología, detectando focos de enfermedad y desenmascarando reservorios desconocidos que han sido tomados como anecdóticos. La principal limitación que encuentran los responsables veterinarios en Zona de Operaciones a la hora de realizar estudios epidemiológicos es el muestreo adecuado y la gestión apropiada de las muestras, debido fundamentalmente a las dificultades logísticas y a la perecibilidad de las muestras biológicas. La alternativa más útil, sin duda, es la utilización del pelo como muestra. Este presenta evidentes ventajas frente a otras. Se puede concluir que resulta una alternativa



fiable y de gran utilidad, fundamentalmente para detectar focos de enfermedad en áreas remotas, y también por la facilidad de obtención y mínimos requisitos logísticos para su remisión a los laboratorios con capacidad de análisis molecular. A esto se debe añadir que es de gran interés para realizar sondeos epidemiológicos entre personas que han podido estar expuestas al vector y detectar posibles fallos en los procedimientos establecidos para el control de los contagios en Zonas de Operaciones.

- La conclusión más clara de este estudio es sin duda que la protección de las tropas es eficaz y que es debida a: un acertado análisis de la situación, una planificación adecuada de las actuaciones, una ejecución correcta de las medidas planificadas y una adecuada asimilación de las medidas de protección personal por parte de los efectivos. La repercusión de asumir las pautas con carácter prioritario en las misiones ha supuesto también, que se interioricen y se apliquen de forma sistemática en territorio nacional. En todas las encuestas realizadas por los oficiales veterinarios, el personal siempre recordaba con claridad las medidas informadas, ya sea por sus propios comandantes de unidad, o por los responsables veterinarios durante las jornadas de concentración. La conclusión, con relación al uso de las medidas de protección, es que todos los efectivos estaban completa y adecuadamente informados sobre los riesgos y las medidas preventivas, tanto en relación con la protección personal, como con las actuaciones de carácter general que llevan a cabo los responsables veterinarios del contingente.

- Se abren algunas incógnitas que pueden orientar futuros estudios. En primer lugar, se pone de manifiesto la necesidad de intensificar los controles, y de establecer una red de monitorización, no solo con relación a la leishmaniosis, sino con respecto a todas las enfermedades de transmisión vectorial. En segundo lugar, sería de gran interés diseñar y ejecutar estudios con el objetivo de establecer los niveles epidemiológicos en los ciclos selváticos, que permitan definir los riesgos de contagio inasumibles, y en base a esto, diseñar estrategias de control específicas para zonas de alta prevalencia, orientado sobre todo a las actuaciones en misiones internacionales.

# Bibliografía

---

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., ... Bates, P. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Akhoundi, M., Votýpka, J., & Kuhls, K. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis | Elsevier Enhanced Reader. Retrieved February 14, 2022, from <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0098299716300450?token=E37F84BD9E276067E28F73E901A90EC47381AE97D5A7DC4F2D3EB380EDC68E91548CC2B353FF50465E22AC80FA3E84DC&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220214160735>
- Aklilu, E., Gebresilassie, A., Yared, S., Kindu, M., Tekie, H., Balkew, M., ... Gebre-Michael, T. (2017). Studies on sand fly fauna and ecological analysis of *Phlebotomus orientalis* in the highland and lowland foci of kala-azar in northwestern Ethiopia. *PLoS ONE*, *12*(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175308>
- Al-Salem, W., Herricks, J. R., & Hotez, P. J. (2016). A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. *Parasites & Vectors*, *9*(1), 460. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1743-7>
- Alexander, B. (1987). Dispersal of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian Coffee Plantation. *Journal of Medical Entomology*, *Volume 24*(Issue 5). <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000300010>
- Alexander, J., & Brombacher, F. (2012). T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant? *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00080>
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M. O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., ... Gradoni, L. (2016). Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(2), e0004458. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458>
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, *57*(04), 1–88. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
- Alvar, J., Croft, S. L., Kaye, P., Khamesipour, A., Sundar, S., & Reed, S. G. (2013). Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.080>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... Boer, M. den. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, *7*(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Alvar, J., Yactayo, S., & Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 22(12), 552–557. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., ... Vilas, F. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Eurosurveillance*, 18(30), 1–9. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20546>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-velez, R., Weina, P., ... Ephros, M. (2016). 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 ), 63. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw670>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., ... Magill, A. (2017). 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). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
- Ashford, R. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 523–532. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7)
- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1269–1281. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00136-3)
- Ashford, R. W. (1997, October). The leishmaniasis as model zoonoses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. <https://doi.org/10.1080/00034989760428>
- Ashford, Richard W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, 14(5), 523–532. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7)
- Ayuso-Sáinz, J. J., Belinchón-Lorenzo, S., Fernández-Cotrino, J., Jiménez, M., Orduña-Domingo, A., & Quinto, E. J. (2022). Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA by Real Time PCR in hair of wild rabbits. *Medycyna Weterynaryjna*, 78(01), 6615–2022. <https://doi.org/10.21521/mw.6615>
- Ballart, C., Guerrero, I., Castells, X., Barón, S., Castillejo, S., Alcover, M. M., ... Gállego, M. (2014). Importance of individual analysis of environmental and climatic factors affecting the density of *Leishmania* vectors living in the same geographical area: The example of *Phlebotomus ariasi* and *P. perniciosus* in northeast Spain. *Geospatial Health*, 8(2), 389–403. <https://doi.org/10.4081/gh.2014.28>
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniasis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324–330.

<https://doi.org/10.1016/J.PT.2008.04.001>

- Bañuls, A. L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*, 64. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)
- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J. C., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., ... Gómez Nieto, L. C. (2013). Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 192(1–3), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.007>
- Belinchón-Lorenzo, S., Parejo, J. C., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., ... Gómez-Nieto, L. C. (2016). First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR. *Veterinary Parasitology*, 228, 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.021>
- Bengtsson, C. F., Olsen, M. E., Brandt, L. Ø., Bertelsen, M. F., Willerslev, E., Tobin, D. J., ... Gilbert, M. T. P. (2012). DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.03.013>
- Board, A. F. P. M. (2001). *Regional Disease Vector Ecology Profile: South Central Asia*. Retrieved from [http://www.afpmb.org/coweb/guidance\\_targets/disease\\_vector/DVEP\\_SCAsia\\_Se p01.pdf%5Cnhttp://yes%5Cnhttp://report](http://www.afpmb.org/coweb/guidance_targets/disease_vector/DVEP_SCAsia_Se p01.pdf%5Cnhttp://yes%5Cnhttp://report)
- Botet Fregola, Jordi. Portús Vinyeta, M. (1993). La leishmaniasis en la España peninsular. Revisión historico- bibliográfica (1912-1985). *Rev San Hig Púb*, (4), 255–266.
- Botet Fregola, J., & Portús Vinyeta, M. (1993). Leishmaniasis in peninsular Spain. A historical-bibliographic review (1912-1985). *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, 67(4), 255–266. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7732292>
- Burkett, D. A., Knight, R., Dennett, J. A., Sherwood, V., Rowton, E., & Coleman, R. E. (2007). Impact of Phlebotomine Sand Flies on U.S. Military Operations at Tallil Air Base, Iraq: 3. Evaluation of Surveillance Devices for the Collection of Adult Sand Flies. *Journal of Medical Entomology*, 44(2), 381–384. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.2.381>
- Burkett, D. A., Knight, R., Dennett, J. A., Sherwood, V., Rowton, E., Coleman, R. E., ... K., B. (2007). Impact of Phlebotomine Sand Flies on U.S. Military Operations at Tallil Air Base, Iraq: 3. Evaluation of Surveillance Devices for the Collection of Adult Sand Flies. *Journal of Medical Entomology*, 44(2), 381–384. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.2.381>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Carcelén, J., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Serrano, F., Parejo, J. C., Corraliza, I.,

- ... Gómez-Nieto, C. (2009). The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, 27, 5964–5973.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.069>
- Chitimia, L., Muñoz-García, C. I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., del Río, L., Murcia, L., ... Berriatua, E. (2011). Cryptic Leishmaniasis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 12–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.016>
- Colacicco-Mayhugh, M. G., Grieco, J. P., Putnam, J. L., Burkett, D. A., Coleman, R. E., M., B., ... J., W. P. (2011). Impact of Phlebotomine Sand Flies on United States Military Operations at Tallil Air Base, Iraq: 5. Impact of Weather on Sand Fly Activity. *Journal of Medical Entomology*, 48(3), 538–545.  
<https://doi.org/10.1603/ME10128>
- Coleman, R. E., Burkett, D. A., Putnam, J. L., Sherwood, V., Caci, J. B., Jennings, B. T., ... Weina, P. J. (2006). Impact of Phlebotomine Sand Flies on U.S. Military Operations at Tallil Air Base, Iraq: 1. Background, Military Situation, and Development of a “Leishmaniasis Control Program” *Journal of Medical Entomology*, 43(4). Retrieved from <http://www.bioone.org/doi/>
- Coleman, R. E., Burkett, D. A., Putnam, J. L., Sherwood, V., Caci, J. B., Jennings, B. T., ... Weina, P. J. (2006). Impact of phlebotomine sand flies on U.S. Military operations at Tallil Air Base, Iraq: 1. background, military situation, and development of a “Leishmaniasis Control Program”. *Journal of Medical Entomology*, 43(4), 647–662. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[647:iopsfo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[647:iopsfo]2.0.co;2)
- Coleman, R. E., Burkett, D. A., Sherwood, V., Caci, J., Dennett, J. A., Jennings, B. T., ... J., W. P. (2011). Impact of Phlebotomine Sand Flies on United State Military Operations at Tallil Air Base, Iraq: 6. Evaluation of Insecticides for the Control of Sand Flies. *Journal of Medical Entomology*, 48(3), 584–599.  
<https://doi.org/10.1603/ME10226>
- Coleman, R. E., Burkett, D. A., Sherwood, V., Caci, J., Spradling, S., Jennings, B. T., ... Putnam, J. L. (2007). Impact of Phlebotomine Sand Flies on U.S. Military Operations at Tallil Air Base, Iraq: 2. Temporal and Geographic Distribution of Sand Flies. *Journal of Medical Entomology*, 44(1), 29–41.  
<https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.29>
- Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L. M., Shaw, J. J., Dye, C., & Paulo, S. (2002). *Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. The Journal of Infectious Diseases* (Vol. 186). Retrieved from  
<https://academic.oup.com/jid/article/186/9/1314/941831>
- Coutinho, M. T. Z., & Linardi, P. M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology*, 147(3–4), 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.008>
- Cowan, D. P. (1984). The use of ferrets (*Mustela furo*) in the study and management of

- the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Zoology*, 204(4), 570–574. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1984.tb02391.x>
- Cox, F. E. G. (2002). History of Human Parasitology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 19(September 2004), 147–153. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595>
- Crum, N. F., Aronson, N. E., Lederman, L. E. R., Usn, M. C., Col, L., Rusnak, J. M., & Cross, J. H. (2005). History of U.S. Military Contributions to the Study of Parasitic Diseases. *Military Medicine*, 170(4), 17–29. Retrieved from [https://academic.oup.com/milmed/article/170/suppl\\_4/17/4577629](https://academic.oup.com/milmed/article/170/suppl_4/17/4577629)
- Cubero, Á., Durántez, C., Almaraz, A., Fernández-Lago, L., Gutiérrez, M. P., Castro, M. J., ... Orduña, A. (2018). Usefulness of a single-assay chemiluminescence test (Tularaemia VIRCLIA IgG + IgM monotest) for the diagnosis of human tularaemia. Comparison of five serological tests. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(4), 643–649. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3155-9>
- Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., ... Otranto, D. (2019). Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12), 1. <https://doi.org/10.3201/EID2512.190164>
- Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S. L., & Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: New approaches to disease control. *British Medical Journal*. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7385.377>
- De Freitas, E., Melo, M. N., Da Costa-Val, A. P., & Michalick, M. S. M. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137(1–2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.011>
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
- Desjeux, P., & Alvar, J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97 Suppl 1(1), 3–15. <https://doi.org/10.1179/000349803225002499>
- F. Eldridge and John D. Edman. (2004). *Medical Entomology*.
- Fabrizio Marçal do Nascimento, L., Dias de Moura, L., Luis Souza dos Santos, A., C Vallur, A., & do Socorro Pires e Cruz, M. (2021). Vaccine as immunotherapy for leishmaniasis. In *Applications of Nanobiotechnology for Neglected Tropical Diseases* (pp. 29–46). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821100-7.00016-9>
- FGS. (1999). Regional Disease Vector Ecology Profile: The Middle East. *Pest Management Information Analysis Center, Armed Forces Pest Management Board, Forest Glen Section, Walter Reed Army Medical Center*. Available: <https://Apps.Dtic.Mil/Dti> (Accessed on 15 January 2020), 1-209. Retrieved from <http://purl.access.gpo.gov/GPO/LPS28798>.
- Figueiró-Filho, E. A., Duarte, G., El-Beitune, P., Quintana, S. M., & Maia, T. L. (2004). Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infectious Disease in Obstetrics*

and Gynecology. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1080/1064744042000210384>

- Fischer, D., Moeller, P., Thomas, S. M., Naucke, T. J., & Beierkuhnlein, C. (2011). Combining climatic projections and dispersal ability: A method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001407>
- Fraih, W., Fares, W., Perrin, P., Dorkeld, F., Sereno, D., Barhoumi, W., ... Zhioua, E. (2017). An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005484>
- Franklinos, L. H. V., Jones, K. E., Redding, D. W., & Abubakar, I. (2019). The effect of global change on mosquito-borne disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(9), e302–e312. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30161-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30161-6)
- Gage, K. L., Burkot, T. R., Eisen, R. J., & Hayes, E. B. (2008). Climate and Vectorborne Diseases. *American Journal of Preventive Medicine*, 35(5), 436–450. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.08.030>
- Gaglio, G., Napoli, E., Falsone, L., Giannetto, S., & Brianti, E. (2017). Field evaluation of a new light trap for phlebotomine sand flies. *Acta Tropica*, 174(June), 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.011>
- Gálvez, R., Descalzo, M. a, Guerrero, I., Miró, G., & Molina, R. (2011). Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniasis sand fly vector in the Madrid region (Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11(7), 799–806. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0109>
- García, N., Moreno, I., Alvarez, J., de la Cruz, M. L., Navarro, A., Pérez-Sancho, M., ... Domínguez, M. (2014). Evidence of *Leishmania infantum* Infection in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a Natural Area in Madrid, Spain. *BioMed Research International*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/318254>
- Garzel, L. M., Hankenson, F. C., Combs, J., & Hankenson, K. D. (2010). Use of quantitative polymerase chain reaction analysis to compare quantity and stability of isolated murine DNA. *Lab Animal*, 39(9), 283–289. <https://doi.org/10.1038/labon0910-283>
- Gil-Collado, J., Márquez, F. M., & Marín, M. S. (1989). Los flebotomos en España. *Revista Sanitaria de Higiene Publica*. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Francisco\\_Morillas-Marquez/publication/20456003\\_Phlebotomus\\_in\\_Spain/links/55f99aca08aeafc8ac266b57.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Morillas-Marquez/publication/20456003_Phlebotomus_in_Spain/links/55f99aca08aeafc8ac266b57.pdf)
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J., & De Miguel, A. G. (2011). Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(5), 820–825. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0310>
- Gilbert, M. T. P., Menez, L., Janaway, R. C., Tobin, D. J., Cooper, A., & Wilson, A. S.

- (2006). Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Science International*, 156(2–3), 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.02.021>
- Gilchrist, K. (1999). En la búsqueda de una vacuna contra la leishmaniasis. *Acta Médica Colombiana*, 24(6), 258–264.
- Gingrich, J. B., Harlan, H. J., Perkins, P. V., & Trosper, J. H. (2001). Regional Disease Vector Ecology Profile Central Europe, 231. Retrieved from <http://oai.dtic.mil/oai/oai?verb=getRecord&metadataPrefix=html&identifier=ADA514062>
- GMAO, G. M. and A. O. (2015). inst3\_3d\_asm\_Cp: MERRA-2 3D IAU State, Meteorology Instantaneous 3-hourly (p-coord, 0.625x0.5L42), version 5.12.4, Greenbelt, MD, USA: Goddard Space Flight Center Distributed Active Archive Center (GSFC DAAC). <https://doi.org/10.5067/VJAFPLI1CSIV>
- González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., & Molina, R. (2017). Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasites & Vectors*, 10(1), 368. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2309-z>
- González, E., Molina, R., Aldea, I., Andrés Iriso, |, Tello, A., & Jiménez, M. (2020). *Leishmania* sp. detection and blood-feeding behaviour of *Sergentomyia minuta* collected in the human leishmaniasis focus of southwestern Madrid, Spain (2012–2017). *Transbound Emerg Dis*, 67, 1393–1400. <https://doi.org/10.1111/tbed.13464>
- González, E., Molina, R., Iriso, A., Ruiz, S., Aldea, I., Tello, A., ... Jiménez, M. (2021). Opportunistic feeding behaviour and *Leishmania infantum* detection in *Phlebotomus perniciosus* females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012–2018). *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(3), e0009240. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009240>
- González, U, Pinart, M., Firooz, S. D., Enk C, Id, V., Tm, E., ... Alvar J. (2015). Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis (Review). *Journal of the American Medical Association*, XXXIV(5), 301. <https://doi.org/10.1001/jama.1900.02460050047010>
- González, Urbà, Pinart, M., Sinclair, D., Firooz, A., Enk, C., Vélez, I. D., ... Alvar, J. (2015). Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008736.pub2>
- Gradoni, L. (2015). Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, 208, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.003>
- Gradoni, L., López-Vélez, R., & Mokni, M. (2017). *World Health Organisation Regional Office for Europe. Manual on case management and surveillance of the Leishmaniasis in the WHO European Region*. Retrieved from [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/EURO\\_WHO\\_Leish\\_manual\\_on\\_case\\_management\\_and\\_surveillance\\_9789289052511\\_2017.pdf?ua=1](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/EURO_WHO_Leish_manual_on_case_management_and_surveillance_9789289052511_2017.pdf?ua=1)
- Grinnage-Pulley, T., Scott, B., & Petersen, C. A. (2016). A Mother's Gift: Congenital



- Transmission of Trypanosoma and *Leishmania* Species. *PLoS Pathogens*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005302>
- Gupta, G., Oghumu, S., & Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of immune evasion in Leishmaniasis. *Advances in Applied Microbiology*, 82, 155–184. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *The Lancet*, 354(9185), 1191–1199. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2)
- Hesam-Mohammadi, M., Rassi, Y., Abai, M. R., Akhavan, A. A., Karimi, F., Rafizadeh, S., ... Sharafkhah, M. (2014). Efficacy of different sampling methods of sand flies (Diptera: Psychodidae) in endemic focus of cutaneous leishmaniasis in Kashan district, Isfahan Province, Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 8(2), 156–162. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4478427/pdf/JAD-8-156.pdf>
- Houweling, T. A. J., Karim-Kos, H. E., Kulik, M. C., Stolk, W. A., Haagsma, J. A., Lenk, E. J., ... de Vlas, S. J. (2016). Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(5), e0004546. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004546>
- INE Carlos III. (2018). Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Años 2017-2018. Retrieved from <http://publicaciones.isciii.es>
- Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Soto, M., Fernández-Cotrino, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., ... Nieto, L. C. G. (2013). Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Tropica*, 128(3), 468–472. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.007>
- Jacobson, R L. (2011). Leishmaniasis in an era of conflict in the Middle East. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 11(3), 247–258. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0068>
- Jacobson, Raymond L. (2011). Leishmaniasis in an era of conflict in the Middle East. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(3), 247–258. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0068>
- JCyL, E. D. (2019). *Informes Epidemiológicos. Enfermedades de declaración obligatoria. Informe epidemiológico. Año 2018*. Retrieved from <http://www.saludcastillayleon.es>
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., & Molina, R. (2013). Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitology Research*, 112(7), 2453–2459. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3406-3>
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., & Molina, R. (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 296–300.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027>

- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, (4), 1–24. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x/pdf>
- Killick-Kendrick, R. (1999). The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*, 17, 279–289. Retrieved from [http://ac.els-cdn.com/S0738081X99000462/1-s2.0-S0738081X99000462-main.pdf?\\_tid=5be5baf0-83f1-11e7-9fd9-00000aacb35d&acdnat=1503046011\\_ed892405812e35c62ab29c22fefb1fe](http://ac.els-cdn.com/S0738081X99000462/1-s2.0-S0738081X99000462-main.pdf?_tid=5be5baf0-83f1-11e7-9fd9-00000aacb35d&acdnat=1503046011_ed892405812e35c62ab29c22fefb1fe)
- Killick-Kendrick, R., Wilkes, T. J., Bailly, M., Bailly, I., & Righton, L. A. (1986). Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 80, 138–142. Retrieved from [https://ac.els-cdn.com/0035920386902130/1-s2.0-0035920386902130-main.pdf?\\_tid=9166c7f4-d46a-11e7-90c3-00000aacb360&acdnat=1511894163\\_15b1ba0a53653613a9279fe238b9c39e](https://ac.els-cdn.com/0035920386902130/1-s2.0-0035920386902130-main.pdf?_tid=9166c7f4-d46a-11e7-90c3-00000aacb360&acdnat=1511894163_15b1ba0a53653613a9279fe238b9c39e)
- Killick-Kendrick, R., Wilkes, T. J., Alexander, J., Bray, R. S., Rioux, J.-A., & Bailly, M. (1985). The distance of attraction of CDC light traps to phlebotomine sandflies. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 60(6), 763–767. <https://doi.org/10.1051/parasite/1985606763>
- Kitchen, L. W., Lawrence, K. L., & Coleman, R. E. (2009). The role of the United States military in the development of vector control products, including insect repellents, insecticides, and bed nets. *Journal of Vector Ecology*, 34(1), 50–61. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2009.00007.x>
- Kizer, K. W., Joseph, S., Moll, M., & Rankin, J. T. (1995, June 16). Unexplained illness among Persian Gulf War veterans in an Air National Guard unit: Preliminary report - August 1990-March 1995. *Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.1995.03530010028012>
- Korzeniewski, K. (2009). Health hazards in Central Asia on Afghanistan example. *International Journal of Health Science*, 2(1), 154–157. Retrieved from <http://ludwig.lub.lu.se/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,uid&db=a9h&AN=37802649&site=ehost-live>
- Krüger, A., Strüven, L., Post, R. J., & Faulde, M. (2011). The sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in military camps in northern Afghanistan (2007–2009), as identified by morphology and DNA ‘barcoding.’ *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 105(2), 163–176. <https://doi.org/10.1179/136485911X12899838683241>
- Lainson, R. (1987). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine Evolution, classification and geographical distribution*. Retrieved from <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0004777310&origin=inward&txGid=013c6f3ed806317c6968aa96279e133f>
- Lane, R. P. (1993). Sand flies (Phlebotominae). In: Lane RP, Crosskey RW, Eds. *Medical insects and arachnids*. London: Chapman and Hall, London. Springer Netherlands. Retrieved from

[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=8cntCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR12&dq=Medical+insects+and+arachnids.&ots=FLaqAIndrl&sig=fN2YxPi8fLDt8lrDL6B4oU6veIE&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Medical insects and arachnids.&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=8cntCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR12&dq=Medical+insects+and+arachnids.&ots=FLaqAIndrl&sig=fN2YxPi8fLDt8lrDL6B4oU6veIE&redir_esc=y#v=onepage&q=Medical+insects+and+arachnids.&f=false)

- Laurenti, M. D., Rossi, C. N., Lúcia, V., Da Matta, R., Tomokane, T. Y., Pereira Corbett, C. E., ... Marcondes, M. (2013). Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Veterinary Parasitology*, *196*, 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>
- Lawyer, P. G., & Perkins, P. V. (2000). Leishmaniasis and Trypanosomiasis. In B. F. Eldridge & J. D. Edman (Eds.), *Medical Entomology: A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods* (pp. 231–298). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-6472-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-011-6472-6_8)
- Lawyer, P., & Young, D. (1991). Diapause and quiescence in *Lutzomyia diabolica* (Diptera:Psychodidae). *Parassitologia*, *33 Suppl*, 353–360. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1841227>
- Leishmaniasis. (n.d.). Retrieved February 3, 2022, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Lewis, D. J. (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Entomology Series*, *45*(2), 121–209. Retrieved from <https://www.biodiversitylibrary.org/page/2304738#page/134/mode/1up>
- Lewis, D. J., & Domoney, C. R. (1966). Sugar meals in Phlebotominae and Simuliidae (Diptera). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, *41*(10–12), 175–179. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3032.1966.TB00340.X>
- Lobo, N. F., Achee, N. L., Greico, J., & Collins, F. H. (2018). Modern vector control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *8*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025643>
- Lucientes, J., Antonio Castillo, J., & Jesús Gracia, M. (2005). Flebotomos, de la biología al control. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, *8*(08). Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080805.html>
- Magill, A. J. (2005). Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. *Infectious Disease Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.11.005>
- Maia, C., & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, *27*(8), 341–344. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008>
- Maia, C., & Cardoso, L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Veterinary Parasitology*, *213*(1–2), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.003>
- Maia, C., & Depaquit, J. (2016). Can Sargentomyia (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite*, *23*, 55. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016062>

- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G., & Cascio, A. (2014). Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 12(6), 563–581. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2014.09.007>
- Marayati, B. F., Schal, C., Ponnusamy, L., Apperson, C. S., Rowland, T. E., & Wasserberg, G. (2015). Attraction and oviposition preferences of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), vector of Old-World cutaneous leishmaniasis, to larval rearing media. *Parasites & Vectors*, 8(1), 663. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1261-z>
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Maroli, Michele, Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., ... Gradoni, L. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine & International Health*, 13(2), 256–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x>
- Martínez, B. F., Barroso, D. G., & Portero, C. (2019). La Leishmaniasis en España: Evolución de los casos notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica desde 2005 a 2017 y resultados de la vigilancia de 2014 a 2017. *Boletín Epidemiológico Semanal*, 27, 15–27. Retrieved from <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/1086>
- Maspi, N., Abdoli, A., & Ghaffarifar, F. (2016). Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and Global Health*, 110(6), 247–260. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1232042>
- McIntyre, S., Rangel, E. F., Ready, P. D., & Carvalho, B. M. (2017). Species-specific ecological niche modelling predicts different range contractions for *Lutzomyia intermedia* and a related vector of *Leishmania braziliensis* following climate change in South America. *Parasites & Vectors*, 10(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2093-9>
- Méndez-Bejarano, C. P., Correa-Cárdenas, C. A., Pérez-Rico, J. J., Romero-Barbosa, Y. A., Rodríguez-Angarita, O., Méndez-Bejarano, C. P., ... Rodríguez-Angarita, O. (2020). Carga parasitaria de *Leishmania* spp. en personal militar colombiano con leishmaniasis cutánea. *Revista Científica General José María Córdova*, 18(29), 237–266. <https://doi.org/10.21830/19006586.515>
- Mendonça, S. C. F. (2016). Differences in immune responses against *Leishmania* induced by infection and by immunization with killed parasite antigen: implications for vaccine discovery. *Parasites & Vectors*, 9(1), 492. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1777-x>
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., & Ferroglio, E. (2011). An Investigation into Alternative Reservoirs of Canine Leishmaniasis on the Endemic Island of Mallorca (Spain). *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(4), 352–357. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01212.x>

- Millán, Javier, Ferroglia, E., & Solano-Gallego, L. (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology Research*, 113(6), 2005–2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2>
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24(8), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.003>
- Moafi, M., Sherkat, R., Taleban, R., & Rezvan, H. (2019). *Leishmania* vaccines entered in clinical trials: A review of literature. *International Journal of Preventive Medicine*. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_116\\_18](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18)
- Mohamed, H. S., Miller, E. N., Peacock, C. S., Khalil, E., Cordell, H. J., Howson, J., ... Blackwell, J. M. (2003). Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. *Genes and Immunity*, 4, 351–355. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363977>
- Molina, R. Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J. A., ... Alvar, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 491–493. Retrieved from [http://ac.els-cdn.com/0035920394904464/1-s2.0-0035920394904464-main.pdf?\\_tid=f19e1434-8da1-11e7-af5d-00000aab0f02&acdnat=1504111414\\_8abd9741de305f15d92edc9d20f336ef](http://ac.els-cdn.com/0035920394904464/1-s2.0-0035920394904464-main.pdf?_tid=f19e1434-8da1-11e7-af5d-00000aab0f02&acdnat=1504111414_8abd9741de305f15d92edc9d20f336ef)
- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., ... Bernal, J. (2012a). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 190(1–2), 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>
- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., ... Bernal, J. (2012b). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology*, 190(1–2), 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>
- Molina, Ricardo, Jiménez, M. Y., & Alvar, J. (2017). *Methods in sand fly research*.
- Monge-Maillo, B., Norman, F. F., Cruz, I., Alvar, J., & López-Vélez, R. (2014). Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), e3021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003021>
- Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., ... Domínguez, M. (2014). Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Veterinary Parasitology*, 199(3–4), 264–267. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.010>
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9), 399–405. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02347-4)
- Müller, N., Welle, M., Lobsiger, L., Stoffel, M. H., Bogenbor, K. K., Hilbe, M., ...

- von Bomhard, W. (2009). Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Veterinary Parasitology*, 166(3–4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.001>
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J. C., Serrano, F. J., ... Gómez-Nieto, L. C. (2013). First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Tropica*, 128(3), 706–709. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.009>
- Muñoz, C., Risueño, J., Yilmaz, A., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., Ortuño, M., ... Berriatua, E. (2017). Investigations of *Phlebotomus perniciosus* sand flies in rural Spain reveal strongly aggregated and gender-specific spatial distributions and advocate use of light-attraction traps. *Medical and Veterinary Entomology*. <https://doi.org/10.1111/mve.12275>
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. In *Lancet* (Vol. 366, pp. 1561–1577). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)
- Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III Ministerio de Ciencia Innovación, C. (2018). *Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Años 2017-2018*. Retrieved from <http://publicaciones.isciii.es>
- Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III Ministerio de Economía Competitividad Ministerio de Sanidad, C., & Sociales Igualdad, S. (2017). *Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual Año 2015 (RENAVE)*. Retrieved from [http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/RENAVE\\_INFORME\\_ANUAL2015.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/RENAVE_INFORME_ANUAL2015.pdf)
- Naqqash, M. N., Gökçe, A., Bakhsh, A., & Salim, M. (2016). Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology Research*, 115(4), 1363–1373. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4898-9>
- Norman, F. F., Chamorro, S., Comeche, B., Pérez-Molina, J. A., & López-Vélez, R. (2020). Update on the major imported helminth infections in travelers and migrants. *Future Microbiology*, 15(6), 437–444. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0273>
- Novo, S. P. C., Leles, D., Bianucci, R., & Araujo, A. (2016). The process of *Leishmania* infection - Disease and new perspectives of paleoparasitology. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58(3). <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658045>
- Okwor, I., & Uzonna, J. E. (2013). The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunologic Research*, 56(1), 163–171. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8389-8>
- Oliva, G., Nieto, J., Foglia Manzillo, V., Cappiello, S., Fiorentino, E., Di Muccio, T., ... Gradoni, L. (2014). A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum*

Transmission Seasons. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003213>

- OMS. (2010). Control de las leishmaniasis. *OMS, Serie de Informes Técnicos 949*.
- OMS. (2017a). Leishmaniasis. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>
- OMS. (2017b). OMS | Malnutrición. Retrieved August 19, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- OMS. (2017c). *Respuesta mundial para el control de vectores – enfoque integrado para el control de las enfermedades de transmisión vectorial* (Vol. 2030). Retrieved from [http://www.who.int/malaria/areas/vector\\_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf](http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf)
- OMS | Enfermedades transmitidas por vectores. (2017). *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/>
- OMS | Leishmaniasis. (2017). *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Ortega-García, M. V., Salguero, F. J., Rodríguez-Bertos, A., Moreno, I., García, N., García-Seco, T., ... Domínguez, M. (2019). A pathological study of *Leishmania infantum* natural infection in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and Iberian hares (*Lepus granatensis*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(6), 2474–2481. <https://doi.org/10.1111/tbed.13305>
- Ortega, M. V., Moreno, I., Domínguez, M., de la Cruz, M. L., Martín, A. B., Rodríguez-Bertos, A., ... García, N. (2017). Application of a specific quantitative real-time PCR (qPCR) to identify *Leishmania infantum* DNA in spleen, skin and hair samples of wild Leporidae. *Veterinary Parasitology*, 243, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.015>
- Oryan, A., & Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>
- Palatnik-de-Sousa, C. B., & Day, M. J. (2011). One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 197. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-197>
- Pandey, S. C., Kumar, A., & Samant, M. (2020). Genetically modified live attenuated vaccine: A potential strategy to combat visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*. <https://doi.org/10.1111/pim.12732>
- Pennisi, M. G. (2015). Leishmaniasis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.023>
- Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., ... Afonso, M. O. (2017). First molecular detection of *Leishmania infantum* in *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) in Alentejo, southern Portugal. *Acta Tropica*, 174(June), 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.020>

- Pigott, D. M., S. Bhatt, N. Golding, K. A. Duda, K. E. Battle, O. J., & Brady, J. P. M. et al. (2014). Global distribution maps of the Leishmaniasis. *ELife*, 2014(3), 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.02851>
- Pombi, M., Giacomi, A., Barlozzari, G., Mendoza-Roldan, J., Macrì, G., Otranto, D., & Gabrielli, S. (2020). Molecular detection of *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* in human blood and *Leishmania (Leishmania) infantum* in *Sergentomyia minuta*: unexpected host-parasite contacts. *Medical and Veterinary Entomology*, 34(4), 470–475. <https://doi.org/10.1111/mve.12464>
- Prado, P., Del, E., De, R., & De, T. (2012). Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España octubre 2012. *Ccaes@msssi.Es Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*. Retrieved from <https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf>
- Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915–1934. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>
- Quinnell, Rupert J, Kennedy, L. J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L. M., ... Ollier, W. E. R. (2003). Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55(1), 23–28. <https://doi.org/10.1007/s00251-003-0545-1>
- Rabello, A., Orsini, M., & Disch, J. (2013). *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. <https://doi.org/10.1179/000349803225002507>, 97(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1179/000349803225002507>
- Ready, P. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6, 147. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveillance : Bulletin Europ??En Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 15(10), 19505. Retrieved from <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.10.19505-en>
- Ready, Paul D. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- Reed, S. G., & Scott, P. (1993). T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology*, 5(4), 524–531. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90033-O](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90033-O)
- Reguera, R. M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C., & Balã Na-Fouce, R. (2016). Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 227, 98–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>
- Reithinger, R. (2016). Global burden of cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30195-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30195-5)
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S.



- (2007a). Review Cutaneous leishmaniasis. *Infection. The Lancet. Com*, 7. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007b). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Remoli, M. E., Jiménez, M., Fortuna, C., Benedetti, E., Marchi, A., Genovese, D., ... Ciufolini, M. G. (2016). Phlebotomus detection in *Phlebotomus perniciosus* from a human leishmaniasis focus in South-West Madrid region, Spain. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1488-3/TABLES/5>
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., da Silva, M. E., dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., & da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An overview of the current status and strategies for control. *BioMed Research International*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/3296893>
- Rodgers, M. R., Popper, S. J., & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 71(3), 267–275. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90031-7)
- Romero, G. A. S., & Boelaert, M. (2010). Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014, December). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
- Ruiz-Fons, F. (2013). *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010., 1–5. Retrieved from <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20541>
- Ruiz-Postigo, J. A., Grout, L., & Jain, S. (2020). Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. *Weekly Epidemiological Record WHO*, 95(25), 265–280. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>
- Sakkas, H., Gartzonika, C., & Levidiotou, S. (2016). Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Journal of Vector Borne Diseases*, 53(1), 8–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27004573>
- Salam, N., Al-Shaqha, W. M., & Azzi, A. (2014). Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10), e3208. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003208>
- Sanidad, M. De. (2012). Evaluación del Riesgo de Transmisión de *Leishmania infantum* En España. Octubre 2012, 26.
- Saridomichelakis, M. N. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: Epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 20(5–6), 471–489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x>
- Saridomichelakis, M. N., & Koutinas, A. F. (2014). Cutaneous involvement in canine

leishmaniasis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Veterinary Dermatology*, 25(2), 61–72. <https://doi.org/10.1111/vde.12105>

- SCHLEIN, Y., BORUT, S., & JACOBSON, R. L. (1990). Oviposition diapause and other factors affecting the egg-laying of *Phlebotomus papatasi* in the laboratory. *Medical and Veterinary Entomology*, 4(1), 69–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00262.x>
- Schönian, G., Mauricio, I., & Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, 26(10), 466–469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.013>
- Schroeder, J., & Aebischer, T. (2011). Vaccines for leishmaniasis: From proteome to vaccine candidates. *Human Vaccines*. <https://doi.org/10.4161/hv.7.0.14556>
- Scorza, B. M., Carvalho, E. M., & Wilson, M. E. (2017). Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews. Immunology*, 16(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Semenza, J. C., & Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(6), 365–375. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70104-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70104-5)
- Semenza, J. C., & Suk, J. E. (2018, February 1). Vector-borne diseases and climate change: A European perspective. *FEMS Microbiology Letters*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx244>
- Serra, P., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., & Ferrer, L. (2003). Case Reports Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain, 35, 320–323. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2746/042516403776148336>
- Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*. <https://doi.org/10.1201/9781420088489.ch8>
- Shimabukuro, P. H. F., De Andrade, A. J., & Galati, E. A. B. (2017). Checklist of American sand flies (Diptera, psychodidae, phlebotominae): Genera, species, and their distribution. *ZooKeys*, 2017(660), 67–106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... The LeishVet Group. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Souza, T. D., Turchetti, A. P., Fujiwara, R. T., Paixão, T. A., & Santos, R. L. (2014). Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Veterinary Parasitology*, 200(3–4), 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.025>
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10(1), 82.

<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

- Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M. J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J., & Amela Heras, C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Revista Española de Salud Pública*, 86(6), 555–564. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272012000600002>
- Tavares Veras, P. S., Moth Fraga, D. B., Silva Solc, M. da, & Sampaio Guedes, C. E. (2014). New advances in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. In *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. <https://doi.org/10.5772/57573>
- Tesh, R. B., Chaniotis, B. N., Peralta, P. H., & Johnson, K. M. (1974). Ecology of viruses isolated from Panamanian phlebotomine sandflies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23(2), 258–269. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1974.23.258>
- Torina, A., Sole, M., Reale, S., Vitale, F., & Caracappa, S. (2008). Use of phlebotomine sand flies as indicator of *Leishmania* prevalence in an endemic area. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 355–357. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.017>
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6(May), 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- Trájer, A. J., Bede-Fazekas, Á., Hufnagel, L., Horváth, L., Bobvos, J., & Páldy, A. (2013). The effect of climate change on the potential distribution of the European phlebotomus species. *Applied Ecology and Environmental Research*, 11(2), 189–208. [https://doi.org/10.15666/aer/1102\\_189208](https://doi.org/10.15666/aer/1102_189208)
- Turchetti, A. P., Souza, T. D., Paixão, T. A., & Santos, R. L. (2014). Review Article Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(4), 403–407. <https://doi.org/10.3855/jidc.4108>
- Valero, N. N. H., & Uriarte, M. (2020). Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitology Research*, 119(2), 365–384. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06575-5>
- Van Thiel, P. P., Leenstra, T., De Vries, H. J., Van Der Sluis, A., Van Gool, T., Krull, A. C., ... Kager, P. A. (2010). Cutaneous leishmaniasis (*Leishmania major* infection) in Dutch troops deployed in Northern Afghanistan: Epidemiology, clinical aspects, and treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(6), 1295–1300. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0143>
- Velez, R., Domenech, E., Rodríguez-Cortés, A., Barrios, D., Tebar, S., Fernández-Arévalo, A., ... Gállego, M. (2020). Evaluation of canine leishmaniasis vaccine CaniLeish® under field conditions in native dog populations from an endemic Mediterranean area—A randomized controlled trial. *Acta Tropica*, 205, 105387. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105387>

- von Stebut, E., & Tenzer, S. (2018). Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *International Journal of Medical Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.002>
- WHO. (2010). Control of the leishmaniasis. *World Health Organization Technical Report Series*, (949). Retrieved from  
[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1)
- Williams, P. (1970). Phlebotomine sandflies and leishmaniasis in British Honduras (Belize). *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(3), 317–363. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(70\)90171-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(70)90171-9)
- Yared, S., Gebreselassie, A., Akililu, E., Deribe, K., Balkew, M., Warburg, A., ... Gebre-Michael, T. (2017). Diversity and altitudinal distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic areas of northwest Ethiopia. *Acta Tropica*, 176(June), 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.008>
- Young, D. G., & Duncan, M. A. (1994). *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. *Memories of the American Entomologic Institute* (Vol. 54). <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Young, D. G., & Lawyer, P. G. (1987). New World Vectors of the Leishmaniasis, 29–71. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4712-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4712-8_2)
- Zanatta Coutinho, M. T., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., De Maria, M., ... Linardi, P. M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128(1–2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>
- Zijlstra, EE. (2016). The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Parasites & Vectors*, 9(1), 464. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1721-0>
- Zijlstra, E. E., & Jorge Alvar. (2012). The Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). [https://doi.org/10.1016/S0033-3182\(99\)71269-7](https://doi.org/10.1016/S0033-3182(99)71269-7)



Praca oryginalna

Original paper

## Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA by Real Time PCR in hair of wild rabbits

JUAN J. AYUSO-SÁINZ<sup>1,2</sup>, SILVIA BELINCHÓN-LORENZO<sup>2</sup>,  
JAVIER FERNÁNDEZ-COTRINA<sup>2</sup>, MARIBEL JIMÉNEZ<sup>3</sup>,  
ANTONIO ORDUÑA-DOMINGO<sup>4</sup>, EMILIANO J. QUINTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Area of Nutrition and Food Science, Faculty of Medicine, University of Valladolid, Spain

<sup>2</sup>LeishmanCeres Laboratory, Parasitology Unit, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Cáceres, Spain

<sup>3</sup>Laboratorio de Entomología Médica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Servicio de Microbiología e Inmunología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain

Received 20.09.2021

Accepted 25.10.2021

Ayuso-Sáinz J. J., Belinchón-Lorenzo S., Fernández-Cotrina J.,  
Jiménez M., Orduña-Domingo A., Quinto E. J.

### Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA by Real Time PCR in hair of wild rabbits

#### Summary

The study of potential wild mammal reservoirs is necessary for the surveillance of leishmaniasis, as *Leishmania* protozoans have been isolated from a wide range of wild and domestic animal species, including *Leporidae*. Recently, it has been demonstrated that both hares and wild rabbits can act as sylvatic reservoirs of *Leishmania*. In Spain, most of the research involving wild rabbits has been developed in the central area of Madrid and in the southeastern Mediterranean coast. We studied the presence of *Leishmania infantum* in 116 wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) captured in Santovenia de Pisuerga, Valladolid, Spain. Hair samples were analyzed by real time PCR. *L. infantum* kinetoplast DNA (kDNA) was detected and quantified in 4 out of 116 analyzed animals. The estimated number of parasites obtained were quite variable, ranging from 2.60 to 276.60. Hair samples can be collected by non-invasive methods, being a proper sample for *Leishmania* detection in wild *Leporidae*, which have an important role as reservoirs of *Leishmania*. Our findings enhance the need for more extensive studies in different geographical areas.

**Keywords:** hair, *Leishmania infantum*, rabbit, kDNA, Real Time PCR

Leishmaniasis is a worldwide zoonoses caused by protozoan *Leishmania*, being *Leishmania infantum* the major cause of leishmaniasis in dogs and immunocompromised people in the Mediterranean area (27).

*Leishmania* parasites have been identified in a large number of wild animal reservoirs, where *Phychodidae* insects of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia* act as vectors (3, 27). A wide range of wild mammals from different orders are adapted to infections by *Leishmania spp.* (4), contrary to dogs and humans (1, 26). Most of the wild reservoirs for all *Leishmania* species belong to the *Rodentia* order (8).

*Lagomorpha* order became a target due to an epidemic outbreak in Madrid (Spain) affecting about 500 immunocompetent people with both skin and visceral clinical expressions from 2009 to 2020 (2, 18). *Leporidae* (especially *Oryctolagus cuniculus* and *Lepus granatensis*) were the reservoirs responsible for the transmission of *L. infantum* to *P. perniciosus* pres-

ent in the area (18, 20). *Leporidae* are highly adapted to *Leishmania* infection and do not develop a visceral form of the disease as seen in canids or humans (8). Recent studies in rabbits revealed no histological lesions typical of leishmaniasis, as well as low parasitic loads. The skin was proven as the organ with the highest parasite load, indicating its importance for both diagnosis and transmission to sand flies (18, 24). Xenodiagnostic studies demonstrated the ability of hares to transmit *L. infantum* to *P. perniciosus* (18, 20) and the detection of *L. infantum* in *P. perniciosus* from the same leishmaniasis focus in Spain (17, 14, 15).

Serological diagnostics methods as ELISA, DFA and IFAT have been performed for the diagnosis of leishmaniasis from rabbits and hares, as well as parasitological methods such as culture and real time PCR in spleen, liver and skin (9, 11, 21). Recently it has been demonstrated that hair samples can be used for the molecular diagnosis of both *L. infantum* and *L. ma-*

for, and be employed in epidemiological, clinical, and experimental infections (5, 16, 22). In addition, hair is easy to obtain, causing no harm to the animals, and *Leishmania* kDNA can remain stable inside hair over time and after extreme environmental conditions (22).

The study of wild mammal reservoirs is essential for leishmaniasis surveillance. In Spain, most of research involving wild rabbits was developed in the central area of Madrid and in the southeastern Mediterranean coast. In the area of Castille and León (North Plateau, Spain), the number of human cases were 15 from 2014 to 2018 (0.13-0.2/100.000 inhabitants) (19). Environmental changes such as disappearance of agriculture, livestock and traditional land uses, the presence of grass and shrubs, absence of predators and competitors and warmer temperatures facilitate the life and reproduction of rabbits and hares (2).

Taking these into account, the aim of this study was to determine by qPCR the presence of *Leishmania* kDNA in wild rabbits that could be reservoirs of the disease in an area of the province of Valladolid in Castille and León (North Plateau, 190 km northwest of Madrid), close to Santovenia de Pisuerga, a recently changed village of around 5.000 inhabitants where shrubs and grass have covered extensive areas mixed with sandy zones very auspicious for sandflies spreading.

#### Material and methods

**Animals.** A sample of 116 wild rabbits was captured between May 2017 and March 2018 in Santovenia de Pisuerga, Valladolid, Spain (ETRS89/UTM Zone 30). The sampling area was divided in 5 zones: Zone 1 (Z1: 19 animals), Z2 (28 animals), Z3 (28 animals), north (Zn: 22 animals) and south (Zs: 19 animals) (Fig. 1). The sampling zones were selected due to changes in their agricultural and livestock use as well as their environmental conditions: shrubs and grass mixed with sand areas. Animals from Z1, Z2, and Z3

could be in contact with each other; animals from Zn and Zs cannot be in contact neither between them nor with the other zones due to the large distances. The animals were captured by ferret hunting (10) under the authorization of the Public Health authorities of the Community of Castilla y León, sedated and euthanized following the national RD 53/2013 and the European Directive 2010/63/EU. Rabbits were transported to the lab within the first 5 h after their capture and were necropsied in a biological safety cabinet. Macroscopic lesions compatible with subclinical infections were not observed.

**Samples.** A number of 50-100 hairs were taken with scissors (avoiding wounds and/or blood spots) from two corporal zones (back and flank), introduced into sterilized plastic bags, and sent to the laboratory. Samples from all rabbits were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction.

**DNA extraction and qPCR analyses.** About 20 hairs from each animal were introduced in screw cap sterile microtubes and incubated overnight at  $56^{\circ}\text{C}$  in 250  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (10 mM TrisCl, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS) with 100 mg/ml of Proteinase K. DNA was extracted using 200  $\mu\text{l}$  of supernatant obtained from processed samples with the GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The qPCR technique used in the present study was performed following previously published protocols (6). Briefly, PCR reactions were carried out in 96 wells plates in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  (4  $\mu\text{l}$  of DNA + 16  $\mu\text{l}$  of Reaction Mix), containing 20  $\mu\text{M}$  of each primer (Leish 1: 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3' and Leish 2: 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), 10  $\mu\text{M}$  of TaqMan Probe (FAM-5'-AAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB), and the iTaq Universal Probes Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). The thermal cycling profile used was one incubation step at  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 min and an initial denaturation step at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and annealing-extension at  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Each amplification run contained positive and negative controls. DNA extracted from 55.000

*L. infantum* promastigotes MCAN/ES/1996/BCN150 zymodeme MON-1 was used as a positive control. DNA extracted from healthy dog blood samples was used as negative control. All analyses were performed in a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems Laboratories, Foster City, CA, USA). To quantify *Leishmania* kDNA, a standard curve was carried out using DNA extracted from six quantities of *L. infantum* parasites (MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1) ranging from 50.000 to 0.5 (dilution factor  $\times 10$ ); DNA was extracted and analyzed together with the hair samples in triplicate. The threshold cycle (Ct) corresponding to the Y-intercept of each analysis (that is, the expected Ct value for the estimated quantity of 1 parasite) was used as cut-off, positive being those

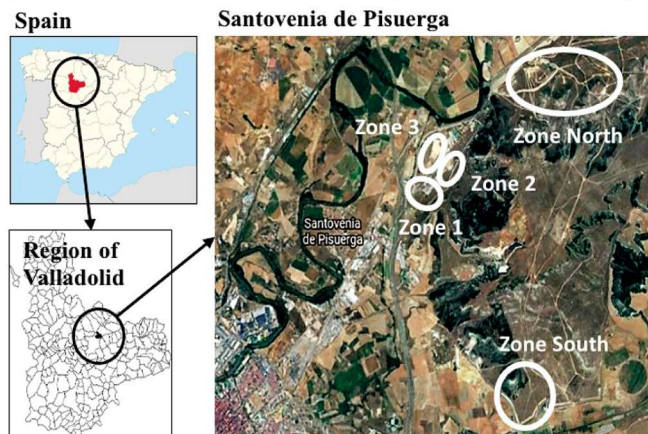


Fig. 1. Geolocation of the areas where wild rabbits were captured for *Leishmania* detection. Areas in Santovenia de Pisuerga, Valladolid, Castille and León, Spain



samples whose Ct values were  $\leq$  Y-intercept value of each assay. Samples were considered positive when the Ct of each one of the triplicates was lower than 32.

### Results and discussion

Table 1 shows qPCR results of hair analysis (from back and flank) of wild rabbits from Valladolid province. The qPCR method was able to detect and quantify the presence of *L. infantum* kDNA in 4 out of 116 (3.5%) analyzed animals. The estimated number of parasites in positive samples were quite variable, ranging from 2.60 to 276.60. The highest quantity of parasite DNA was observed in the Z1 geographical area, being the estimated number of parasites in the hair of one individual (No. 15) up to 100 times greater than that observed in other animals. The results from animal No. 12 gave a Ct value (32.15) close to the threshold (32.00) but it was considered as negative. No positive results were found in animals from Z2, Z3, Zn or Zs areas. The reliability of the results obtained was assessed by the  $R^2$  coefficient data (from 0.996 to 0.999), slope (from  $-3.36$  to  $-3.33$ ) and the high efficiency reached (between 98.56% and 99.64%). Hair samples can be obtained by non-invasive methods in wild animals and they are stable to the environmental conditions of storage and transport (7, 12, 13). Moreover, hair protects parasitic DNA from external degradation, storage at  $-80^\circ\text{C}$ , desiccation and UV radiation (22). Our results demonstrate that hair is a proper sample for *Leishmania* detection in wild *Leporidae*.

The variability observed among animals regarding parasite load was in accordance with other studies previously published where scarce positive animals and low clinical impact were described (11, 23, 24). Ortega et al. (23) studied the presence of *L. infantum* in leporids detecting for the first time *L. infantum* DNA in 67% (22/33) and 53% (17/32) of hair samples from rabbits and hares, respectively. These authors also found that the 100% (7/7) of rabbits and 33% (1/3) of hares were positive to the presence of *L. infantum* in all samples studied: spleen, skin and hair. This could be due to the fact that wild mammals would act as asymptomatic reservoirs since no macroscopic lesions were detected in post-mortem examination of positive animals (24). In the present study, no macroscopic lesions were found during the necropsy of the rabbits. Some authors (21, 25) reported that the absence of lesions could be due to (i) a recent association between the host and the parasite, (ii) to a low number of parasites or (iii) a reduced virulence of the parasite maximizing its transmission.

The knowledge of the ecology of leishmaniosis requires hard work to identify the hosts involved in

**Tab. 1. Real Time PCR results of the analysis of hair (from back and flank). A positive PCR result was considered when the Ct mean (from triplicate analyses) was lower than 32. No positive results were found in animals from Z2, Z3, Zn or Zs areas. ND, not detected**

Area	No. of animals	No. of positives	Animal No.	Ct mean	Mean of estimated no. of parasites
Z1	19	4	1-4, 8, 10, 14	ND	-
			5	36.75	-
			6	31.14	2.60
			7	37.68	-
			9	39.78	-
			11	38.40	-
			12	32.15	-
			13	35.93	-
			15	24.52	276.60
			16	27.38	36.45
Z2	28	0	3-13, 15, 18, 20-28	ND	-
			1	35.61	-
			2	38.95	-
			14	38.76	-
			16	38.72	-
			17	36.91	-
			19	36.88	-
			2-28	ND	-
Z3	28	0	1	38.34	-
Zn	22	0	1-22	ND	-
Zs	19	0	1-19	ND	-

the disease in different geographical areas. The studies involving wild mammals need costly techniques based on *post mortem* analysis or *in vivo* sampling (22). Xenodiagnostic studies already performed with wild rabbits and Iberian hares proved that these mammals are able to transmit *L. infantum* to *P. perniciosus* being strong evidence of its role in *Leishmania* transmission even those without clinical signs (20).

In Spain, *L. infantum* has been investigated in wild rabbits and hares in two geographical areas, i.e., Madrid (2, 11, 18, 23) and the southeastern Mediterranean coast (9). In the present study, the sampling area was close to a village with recently changed country areas that could promote the spreading of sand flies and rabbits.

Our results demonstrate that hair is a proper sample for *Leishmania* detection in wild *Leporidae*, as it has also been proven in other wild mammals. The results of the present study show the important role of wild *Leporidae* – rabbits in the present work – as reservoirs of *Leishmania*, leading to the need for more extensive studies together with an entomological survey to elucidate the possible role of wild rabbits in a sylvatic cycle of transmission of *L. infantum* in this area.



## References

- Alvar J., Vélez I. D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jamin J., Boer M. den: Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012, 7, e35671.
- Arce A., Estirado A., Ordobas M., Sevilla S., García N., Moratilla L., de la Fuente S., Martínez A. M., Pérez A. M., Aránguez E., Iriso A., Sevillano O., Bernal J., Vilas F.: Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain 2009 to 2012. *Eurosurveillance* 2013, 18, 1-9.
- Ashford R.: The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1269-1281.
- Ashford R. W.: Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 1996, 14, 523-532.
- Belinchón-Lorenzo S., Iniesta V., Parejo J. C., Fernández-Cotrino J., Muñoz-Madrid R., Soto M., Alonso C., Gómez-Nieto L. C.: Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2013, 192, 43-50.
- Belinchón-Lorenzo S., Parejo J. C., Iniesta V., Fernández-Cotrino J., Muñoz-Madrid R., Monroy I., Baz V., Gómez-Luque A., Serrano-Aguilera F. J., Barneto J. L., Gómez-Nieto L. C.: First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR. *Vet. Parasitol.* 2016, 228, 65-68.
- Bengtsson C. F., Olsen M. E., Brandt L. O., Bertelsen M. F., Willerslev E., Tobin D. J., Wilson A. S., Gilbert M. T. P.: DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail. *Ann. Anat. - Anat. Anzeiger* 2012, 194, 17-25.
- Burza S., Croft S. L., Boelaert M.: Leishmaniasis. *Lancet* 2018, 392, 951-970.
- Chitmiia L., Muñoz-García C. I., Sánchez-Velasco D., Lizana V., del Río L., Murcia L., Fisa R., Riera C., Giménez-Font P., Jiménez-Montalbán P., Martínez-Ramírez A., Meseguer-Meseguer J. M., García-Macete I., Sánchez-Isarría M. A., Sanchis-Mosonis G., García-Martínez J. D., Vicente V., Segovia M., Berriatua E.: Cryptic Leishmaniasis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 2011, 181, 12-16.
- Cowan D. P.: The use of ferrets (*Mustela furo*) in the study and management of the European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Zool.* 1984, 204, 570-574.
- García N., Moreno I., Alvarez J., de la Cruz M. L., Navarro A., Pérez-Sancho M., García-Seco T., Rodríguez-Bertos A., Conty M. L., Toriño A., Prieto A., Domínguez L., Domínguez M.: Evidence of *Leishmania infantum* Infection in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a Natural Area in Madrid, Spain. *Biomed Res. Int.* 2014, 2014, 1-5.
- Garzel L. M., Hankenson F. C., Combs J., Hankenson K. D.: Use of quantitative polymerase chain reaction analysis to compare quantity and stability of isolated murine DNA. *Lab. Anim. (NY)* 2010, 39, 283-289.
- Gilbert M. T. P., Menez L., Janaway R. C., Tobin D. J., Cooper A., Wilson A. S.: Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Sci. Int.* 2006, 156, 208-212.
- González E., Jiménez M., Hernández S., Martín-Martín I., Molina R.: Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasit. Vectors* 2017, 10, 368.
- González E., Molina R., Iriso A., Ruiz S., Aldea I., Tello A., Fernández D., Jiménez M.: Opportunistic feeding behaviour and *Leishmania infantum* detection in *Phlebotomus perniciosus* females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012-2018). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021, 15, e0009240.
- Iniesta V., Belinchón-Lorenzo S., Soto M., Fernández-Cotrino J., Muñoz-Madrid R., Monroy I., Baz V., Gómez-Luque A., Parejo J. C., Alonso C., Nieto L. C. G.: Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Trop.* 2013, 128, 468-472.
- Jiménez M., González E., Iriso A., Marco E., Alegret A., Fúster F., Molina R.: Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.* 2013, 112, 2453-2459.
- Jiménez M., González E., Martín-Martín I., Hernández S., Molina R.: Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet. Parasitol.* 2014, 202, 296-300.
- Martínez B. F., Barroso D. G., Portero C.: La Leishmaniasis en España: Evolución de los casos notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica desde 2005 a 2017 y resultados de la vigilancia de 2014 a 2017. *Boletín Epidemiológico Sem.* 2019, 27, 15-27.
- Molina R., Jiménez M. I., Cruz I., Iriso A., Martín-Martín I., Sevillano O., Melero S., Bernal J.: The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 2012, 190, 268-271.
- Moreno I., Alvarez J., García N., de la Fuente S., Martínez I., Marino E., Toriño A., Goyache J., Vilas F., Domínguez L., Domínguez M.: Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet. Parasitol.* 2014, 199, 264-267.
- Muñoz-Madrid R., Belinchón-Lorenzo S., Iniesta V., Fernández-Cotrino J., Parejo J. C., Serrano F. J., Monroy I., Baz V., Gómez-Luque A., Gómez-Nieto L. C.: First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* 2013, 128, 706-709.
- Ortega M. V., Moreno I., Domínguez M., de la Cruz M. L., Martín A. B., Rodríguez-Bertos A., López R., Navarro A., González S., Mazariegos M., Goyache J., Domínguez L., García N.: Application of a specific quantitative real-time PCR (qPCR) to identify *Leishmania infantum* DNA in spleen, skin and hair samples of wild Leporidae. *Vet. Parasitol.* 2017, 243, 92-99.
- Ortega-García M. V., Salguero F. J., Rodríguez-Bertos A., Moreno I., García N., García-Seco T., Luz Torre G., Domínguez L., Domínguez M.: A pathological study of *Leishmania infantum* natural infection in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and Iberian hares (*Lepus granatensis*). *Transbound. Emerg. Dis.* 2019, 66, 2474-2481.
- Quinnell R. J., Courtenay O.: Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2009, 136, 1915-1934.
- Ruiz-Postigo J. A., Grout L., Jain S.: Global leishmaniasis surveillance, 2017-2018, and first report on 5 additional indicators. *Wkly. Epidemiol. Rec. WHO* 2020, 95, 265-280.
- WHO: Control of the leishmaniasis. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 2010.

Corresponding author: Emiliano J. Quinto, Area of Nutrition and Food Science, Faculty of Medicine, University of Valladolid, Spain; e-mail: [equinto@uva.es](mailto:equinto@uva.es)

