Universidad Rey Juan Carlos

TESIS DOCTORAL

Estudio del impacto del brote de leishmaniasis en la cohorte de pacientes VIH del Hospital Universitario de Fuenlabrada.

Autora:

Alicia Castro Gordon

Director:

Juan Víctor San Martín

Programa de Doctorado en ciencias de la salud

Escuela Internacional de Doctorado

2016

Agradecimientos

A mis padres, que siempre me han enseñado que hay que luchar por las cosas que uno quiere hacer, y siempre me han hecho sentir que podía hacer todo lo que me propusiera.

A mi hermano, por que claramente no sería lo que soy hoy sin su ejemplo.

Para Mathieu, mi mayor apoyo y estímulo, y mi alegría.

A Juan Víctor, sin el cual nunca podría haber acabado esta obra. Gracias por tu aguante, ayuda infinita y paciencia.

Indice

I. SITUACION ACTUAL DEL PROBLEMA 1

1. Historia 3

2. Epidemilogia 5

2.1 Clasificaciones 6

2.2 Distribución geográfica L. Infantum a nivel mundial 8

2.3 Distribución geográfica L. Infantum en Euripa 10

2.4 Brote de leishmaniasis visceral en el suroeste de Madrid 12

3. Etiología: Parasito, ciclo, vector y reservorio 15

3.1 El parásito y su ciclo: Leismania spp. 15

3.2 El vector: phlebotomus 17

3.3 El reservorio 20

3.4 Fluctuaciones en la incidencia y perioricidad de los brotes 21

4. Patogenia 23

5. Manifestaciones clínicas: Leishmaniasis visceral 26

6. Técnicas diagnosticas de Leishmaniasis visceral para L. infantum 28

7. Tratamiento de Leishmaniasis visceral por L. infantum 34

8. La coinfección: Leishmaniasis visceral en pacientes VIH 40

8.1 Epidemiología y datos estadisticis de la coinfección LEISHMANIA/VIH en el mundo 41

8.2 Información epidemiológica en Europa 43

8.3 Patogénesis de la coinfección 50

8.4Técnicas diagnósticas en la coinfección 52

8.5 Clínica de leishmaniasis visceral en pacientes con infección VIH 56

8.6 Tratamiento de leishmaniasis visceral en pacientes coinfectados 57

8.7 Terapia antiretroviral de alta actividad (TARGA/HAART) y profilaxis secundaria 59

8.8 Papel de la respuesta celular a estimulación con Antígeno Soluble de Leishmania (SLA) en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con coinfeccileishmania/VIH 61

9. Pacientes infectados por Leishmaniasis asintomáticos 64

II. OBJETIVOS ***67***

OBJETIVOS ESPECÍFICOS *70*

1. *Estimar a prevalencia de exposición a Leishmania infantum* *70*
2. *Determinar la incidencia acumulada y tasa de incidencia de Leishmaniasis visceral en la cohorte de pacientes VIH que viven en la zona de brote* *71*
3. *Descripcióin del cuadro clínico y evolución de los pacientes que han desarrollado la enfermedad durante el estudio* *72*
4. *Comparativa de cuadro clínico, pruebas diagnósticas e inmunológicas entre pacientes inmunocompetentes, VIH y en tratamento inmunosupresor* *74*
5. *Determinación de factores de riesgo para el desarrollo de leishmaniasis en subpoblaciones (coinfección con VHC, raza negra...)* *75*
6. *Validar la utilidad del test de linfoproliferación a SLA como marcador de curación que permita la retirada de la profilaxis secundaria en pacientes con test positivo* …… *77*

III. MATERIAL Y METODOS ***79***

1.TIPO DE ESTUDIO *81*

2. CARACTERISTICAS DE LA POBLACIÓN DE FUENLABRADA Y SU POBLACIÓN VIH *82*

2.1 El Hospital de Fuenlabrada *85*

2.2 Población VIH en el Hospital de Fuenlabrada *88*

3.SELECCION DE SUJETOS *90*

4. VARIABLES DE ESTUDIO *91*

5. PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS *93*

5.1 Exámenes parasitológicos *93*

5.2 Aislamiento de ADN genómico y PCR en tiempo real *94*

5.3 Estudio de la respuesta inmune *95*

6. ESTRUCTURA DEL ESTUDIO *99*

7. ANALISIS ESTADISTICO *105*

8. FINANCIACION *105*

IV. RESULTADOS ***107***

OBJETIVO 1. Prevalencia de exposición a Leishmania infantum 109

OBJETIVO 2. Estimación de la incidencia acumulada y tasa de incidencia de leishmaniasis visceral en la cohorte de pacientes VIH que viven en la zona de brote *112*

OBJETIVO 3. Descripción del cuadro clínico y evolución de los pacientes que han desarrollado la enfermedad durante el estudio *113*

3.1. Leishmaniasis cutánea *113*

3.2. Leishmaniasis visceral 115

3.2.1 Características epidemiológicas 115

3.2.2 Clínica 119

3.2.3 Parámetros analíticos 125

3.2.4 Pruebas diagnósticas 126

3.2.5 Tratamiento recibido y profilaxis realizada 127

OBJETIVO 4.Comparativa de cuadro clínico, pruebas diagnósticas e inmunológicas entre pacientes inmunocompetentes, VIH y en tratamiento inmunosupresor *130*

4.1 Características epidemiológicas *131*

4.2 Clínica *131*

4.3 Signos y exploración *134*

4.4 Comparativa de las pruebas diagnósticas e inmunológicas *137*

4.5 Comparativa de la respuesta linfoproliferativa con SLA (Soluble Leishmania Antigen) entre los diferentes grupos de pacientes según situación inmunológica *140*

OBJETIVO 5. Determinación de factores de riesgo para la exposición y el desarrollo de leishmaniasis en subpoblaciones (coinfección con VHC, raza negra...) *144*

5.1 Factores de riesgo para la exposición a Leishmania infantum durante el brote *144*

5.2 Factores de riesgo para desarrollar Leishmaniasis visceral durante el brote *148*

5.3 Análisis de factores de riesgo para enfermar (o no) en pacientes con menos de 100 CD4+ durante el brote *154*

OBJETIVO 6. Validar la utilidad del test de linfoproliferación a SLA como marcador de curación que permita la retirada de profilaxis secundaria *155*

V. DISCUSION ***163***

1.Homogeneidad de la muestra y población VIH *165*

2.Prevalencia de exposición a Leishmania infantum en pacientes VIH en zona de brote *167*

3.Determinar la incidencia acumulada y la tasa de incidencia de Leishmaniasis visceral en la cohorte VIH en zona de brote *173*

4.Leishmaniasis cutánea en pacientes VIH de nuestra cohorte *176*

5. Leishmaniasis visceral en los pacientes VIH de nuestra cohorte y comparación con el grupo de pacientes inmunocompetentes y bajo tratamiento inmunosupresor *180*

5.1 Características de los pacientes *180*
5.2 Clínica presentada: síntomas, signos y exploración física *184*
5.3 Pruebas analíticas: Alteraciones hematológicas, velocidad de sedimentación, ferritina y proteína C reactiva *186*
5.4 Pruebas diagnósticas *190*
5.5 Tratamientos, recaídas y efectos secundarios *195*
6. Factores predictores de recaída y marcadores de enfermedad: el papel de la respuesta linfoproliferativa tras estimulación con antígeno de leishmania (SLA) como predictor de recaída de leishmaniasis visceral en pacientes VIH *198*
6.1 Propuesta de seguimiento de pacientes VIH basado en test SLA *202*
6.2 Comparación de la respuesta linfoproliferativa tras estimulación con antígeno de leishmania (SLA) entre los diferentes grupos *203*
7. Factores de riesgo para la exposición a L. infantum durante el brote *205*
8. Factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad durante el brote *208*

VI. CONCLUSIONES ***213***

VII. BIBLIOGRAFIA ***219***

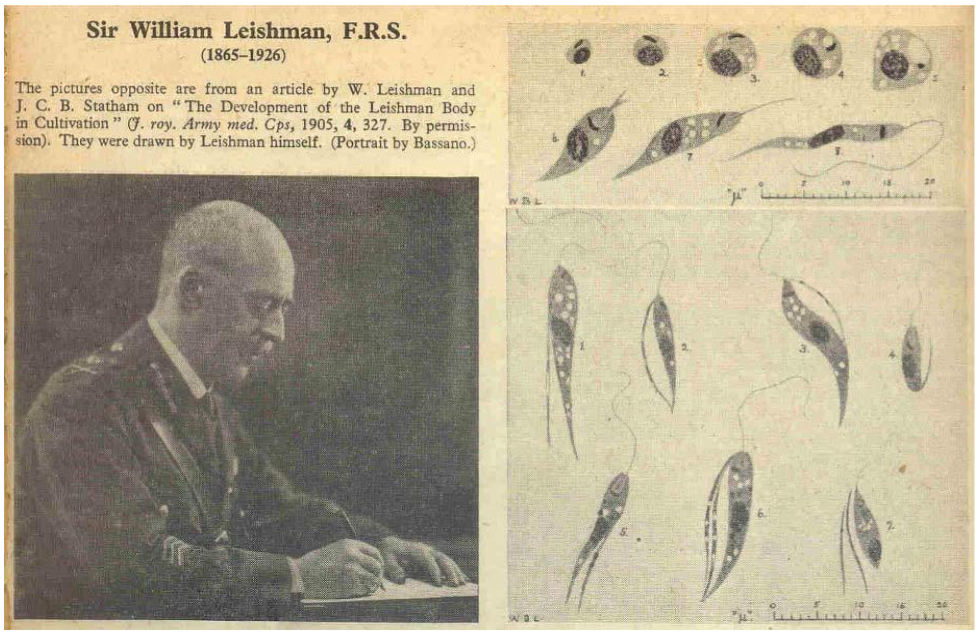
VIII. ANEXOS ***237***
ANEXO I: Test de homogeneidad de muestra seleccionada para estudio de test parasitológicos y de respuesta inmune *239*
Anexo II. Consentimiento informado para participar en el estudio de investigación *242*

I. SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA

1.Historia

La leishmaniasis es una enfermedad de cuyos orígenes no hay datos claros, aunque se presume que convive con la Humanidad desde hace miles de años. Existen descripciones de un cuadro compatible con leishmaniasis visceral o Kala-azar que datan del año 1500. No fue hasta finales del siglo XIX y principios del XX que se obtuvieron las primeras muestras y aislamientos del parásito. Durante aquellas épocas, no era extraño confundir esta entidad con la malaria, de distribución semejante, y mucho mejor caracterizada, pero la falta de periodicidad de la fiebre y la escasa respuesta a la quinina hizo que se sospechara que se trataba de una enfermedad causada por tripanosomas.

En 1900, Leishman describe unos cuerpos de inclusión particulares en el bazo de un soldado que había muerto a causa de la fiebre Dum-Dum (padecía fiebre, anemia, atrofia muscular y esplenomegalia) (1).



British Medical Journal 12 February 1966, Page 414

En 1903 fueron publicados sus trabajos en el British Medical Journal y durante el mismo periodo, Charles Donovan (2) reconocía paralelamente los mismos síntomas en otros pacientes con Kala-Azar y los mismos hallazgos microscópicos en el bazo. No fue hasta posteriormente, que el famoso parasitólogo de la época, Ronald Ross, describió en honor a estos dos investigadores el Genero Leishmania y la especie *donovani*. Cathoire y Laveran encontraron en 1904 Leishmania en niños con anemia y esplenomegalia y Nicolle nombró al parásito Leishmania *infantum*, identificando también como reservorios a los perros y cultivándolo en laboratorio.

En 1922 en la India, Bramachari describe el PKDL (Post-kala-azar dermal leishmaniasis) y en 1940, Swaminath, Shortt y Anderson en la India y Adler y Ber en Palestina, demuestran la transmisión de L. *donovani* y L. t*ropica* por las moscas del género Phlebotomus, también conocidas como moscas de arena.

Posteriormente, de manera gradual, se fueron describiendo la clínica y sus diferentes formas de presentación, su distribución geográfica y el estudio de reservorios y vectores, así como el ciclo del parásito, comprendiéndose mejor cómo infecta a los humanos (3).

En cuanto al tratamiento, los antimoniales trivalentes fueron introducidos entre 1912 y 1915 para tratar respectivamente la leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Brasil y la leishmaniasis visceral en Italia. Pero no fue hasta 1922 que se introdujeron los antimoniales pentavalentes, que son mucho más seguros y que se han mantenido como tratamiento de primera elección durante décadas hasta que en 1996 se comenzó a utilizar anfotericina B liposomal, y en entre los años 2004 y 2006 se descubrieron las dos últimas drogas utilizadas para combatir esta enfermedad; la miltefosina y la paramomicina.

2.Epidemiología

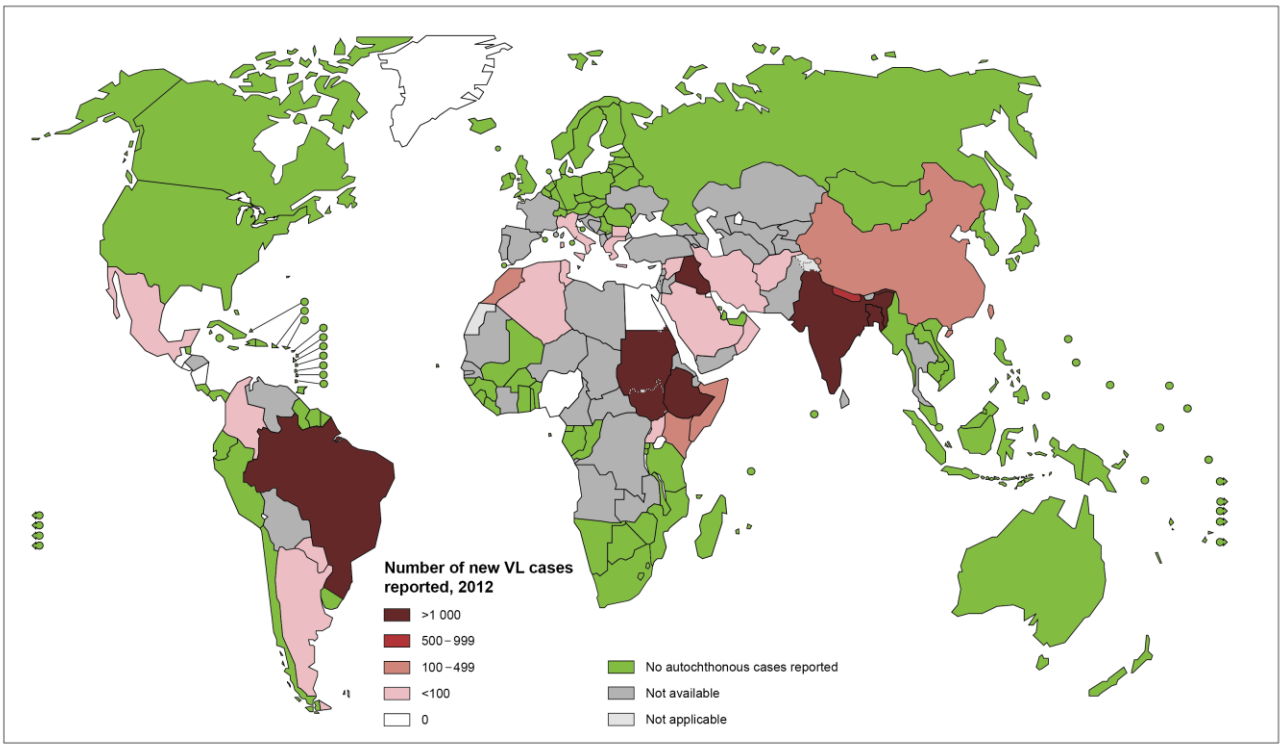
La leishmaniasis es una zoonosis de distribución mundial, abarcando amplias regiones de todo el mundo. A pesar del largo alcance de esta zoonosis, que se estima que ocupa el noveno puesto en lo que a morbilidad se refiere, dentro de las enfermedades infecciosas a nivel mundial se engloba dentro de lo que se denominan enfermedades olvidadas(4). Dentro de este grupo, denominado en inglés "Neglected Tropical Diseases" (NTD), se encuentran otras enfermedades como el dengue, la enfermedad de Chagas y diferentes parasitosis. Tienen en común el ser enfermedades de amplia distribución mundial, con gran morbilidad y en ocasiones mortalidad, que a pesar de afectar a un gran número de personas, son enfermedades que reciben poca atención e inversión por parte de las autoridades sanitarias, y no existen grandes avances en la investigación, tanto en el tratamiento como en las pruebas diagnósticas.

La leishmaniasis es endémica en 93 países, afectando a 5 continentes. Las estimaciones cifran en unos 200,000 y 400,000 nuevos casos anuales de leishmaniasis visceral (5). Más del 90% de estos casos se declaran en 6 países: Brasil, India, Bangladesh, Etiopía, Sudán y Sudán del Sur. Estas cifras han de considerarse con cautela, ya que existe una importante infranotificación de los casos, y existen países con grandes poblaciones afectas, de los que existen pocos datos recogidos, como son el caso de China, Iraq o Argelia, entre otros, dados los limitados medios de diagnóstico y la posible confusión con otras enfermedades de amplia distribución en las mismas zonas como la malaria.

Se pueden observar los datos de endemicidad de 2012 según la OMS en la Figura 1:

Figura 1.

Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

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

World Health Organization

2.1 Clasificaciones

Clásicamente, se ha dividido la leishmaniasis entre el "Viejo Mundo" y " Nuevo Mundo". Aunque actualmente ya no hay razón taxonómica para este tipo de clasificación, se sigue utilizando de manera habitual, sirviendo para clasificarla a nivel clínico, dados sus tropismos específicos (viscerotrópico, mucotrópico, dermatotrópico…) distribución geográfica, etc… (ver Tabla 1)

Clásicamente la leishmaniasis del “Viejo Mundo” comprende una distribución en África, Asia y el Mediterráneo, mientras la leishmaniasis del "Nuevo Mundo" presenta una distribución principalmente en centro y sur América (6).

Tabla 1. Extraída del informe: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010.

***Leishmania* found in humans**

Subgenus	*L. (Leishmania)*	*L. (Leishmania)*	*L. (Viannia)*	*L. (Viannia)*
Old World	*L. donovani* *L. infantum*	*L. major* *L. tropica* *L. killicki*[a] *L. aethiopica* *L. infantum*		
New World	*L. infantum*	*L. infantum* *L. mexicana* *L. pifanoi*[a] *L. venezuelensis* *L. garnhami*[a] *L. amazonensis*	*L. braziliensis* *L. guyanensis* *L. panamensis* *L. shawi* *L. naïffi* *L. lainsoni* *L. lindenbergi* *L. peruviana* *L. colombiensis*[b]	*L. braziliensis* *L. panamensis*
Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic	Mucotropic

[a] Species status is under discussion
[b] Taxonomic position is under discussion

Estos subgéneros componen el amplio espectro de presentaciones clínicas a lo largo del mundo, que varían según el subgénero, el país y la condición del propio enfermo; aunque en función de la forma de presentación clínica la leishmaniasis se puede clasificar como leishmaniasis cutánea, visceral y mucocutánea.

En esta tesis nos centraremos en la descripción de la leishmaniasis visceral producida por Leishmania *infantum*, que es el principal objeto de dicha tesis, y brevemente de la

cutánea. L. *infantum* presenta la peculiaridad de ser la única especie capaz de producir en pacientes aparentemente inmunocompetentes formas viscerales y cutáneas, aunque nunca las dos presentaciones en el mismo paciente.

2.2 Distribución geográfica L. infantum a nivel mundial.

La distribución geográfica de Leishmania *infantum* comprende principalmente el área Mediterránea, zonas del Norte de África, Península Arábiga y norte de China, como se puede ver en el mapa en la Figura 2. También se han descrito casos de leishmaniasis visceral, y cada vez en un número mayor, en el Nuevo Mundo, principalmente en Brasil.

En el momento actual existe una gran preocupación ya que se está produciendo un aumento importante del área de distribución geográfica de dicho parásito, en parte debido a un aumento de población expuesta a los vectores de transmisión. Esta trasmisión ocurre tras la picadura del vector, que se trata de una hembra del género Phlebotomus. El cambio en las últimas décadas del tipo de trabajo realizado en las distintas poblaciones, aumentando las áreas urbanizadas y la realización de trabajos más industrializados (minería, aumento de carreteras en áreas selváticas, construcción de presas, etc…), conlleva un aumento de la exposición a Phlebotomus, y hace que la población expuesta aumente. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se espera un aumento de los casos de leishmaniasis, así como un aumento de la posibilidad de brotes.

La leishmaniasis visceral tiene una menor distribución geográfica en comparación con la leishmaniasis cutánea, con el 90 % de lo casos notificados en 6 países (India, Sudan, Sudán del sur, Bangladesh, Etiopía y Brasil (ver la tabla 2) extraída del artículo de J. Alvar et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, 2012 (7).

Figura 2. Imagen extraída del artículo: Leishmania donovani in Cyprus. Maria Antoniou et al. (8)

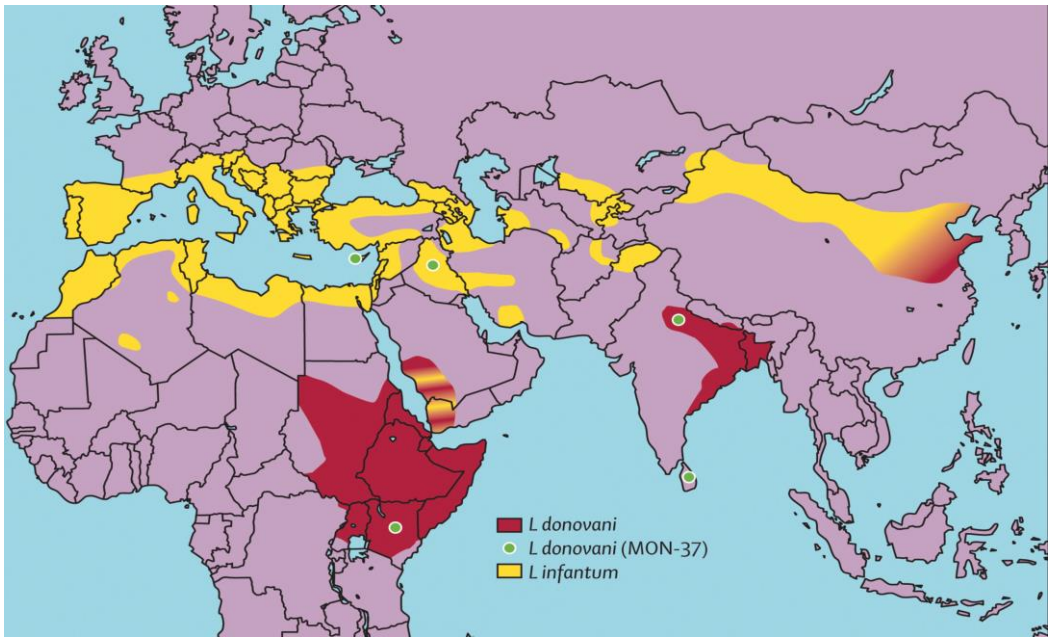


Tabla 2. J. Alvar et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, 2012 (7).

	Reported VL cases/year	Countries with 5 years of data	Estimated annual VL incidence		
Americas	3662	8/11 (73%)	4500	to	6800
Sub-Saharan Africa	1	3/11 (27%)			
East Africa	8569	5/8 (63%)	29,400	to	56,700
Mediterranean	875	21/26 (81%)	1200	to	2000
Middle East to Central Asia	2496	14/17 (82%)	5000	to	10,000
South Asia	42,623	3/6 (50%)*	162,100	to	313,600
Global total	58,227	54/79 (68%)	202,200	to	389,100

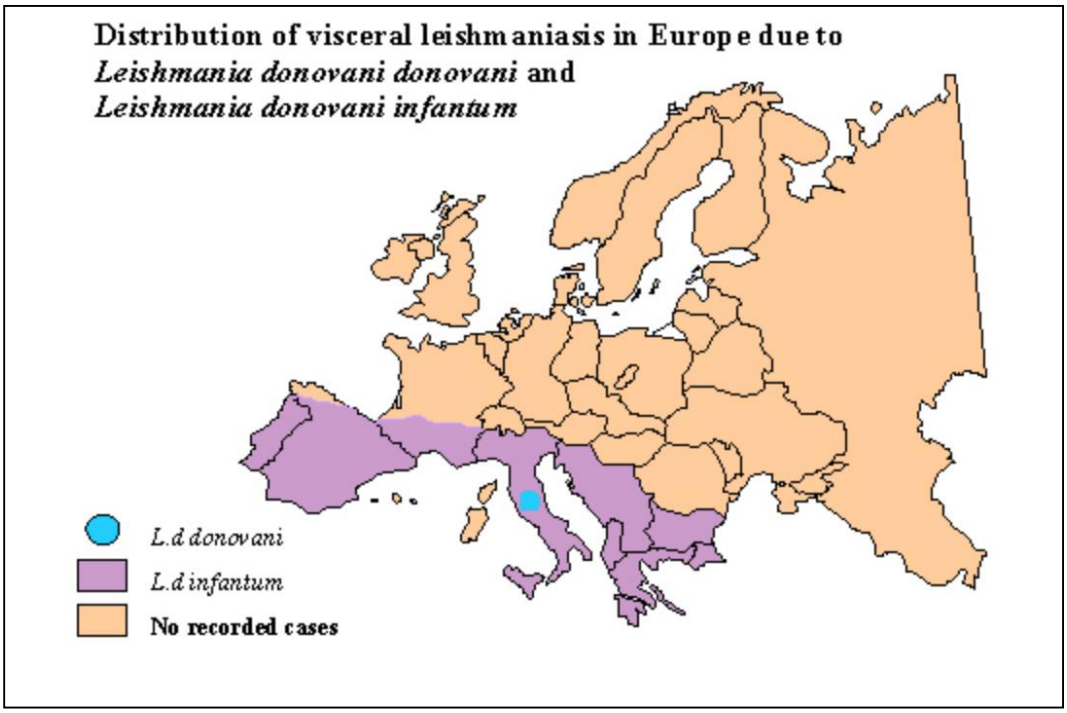
*3/3 (100%) of high burden countries (India, Bangladesh, Nepal) reported 5 years of data. Reports incomplete for Sri Lanka, Bhutan and Thailand.
doi:10.1371/journal.pone.0035671.t013

2.3 Distribución geográfica L. infantum en Europa.

Los países que clásicamente notifican el mayor número de casos en Europa son Italia, Francia, España y Portugal. En los últimos años con muchos casos declarados en Albania y Turquía (9). Actualmente, comienzan a notificarse casos en otras zonas de Europa, por ejemplo Alemania (10), de pacientes expuestos en viajes de turismo, migrantes, etc…

La mayor parte de los casos se presenta en zonas rurales y áreas montañosas, pero de manera cada vez más frecuente, en zonas urbanas y periurbanas donde los reservorios suelen ser los perros, pero también otros animales recientemente descritos, como las liebres en el caso del brote de Madrid de 2009 (11).

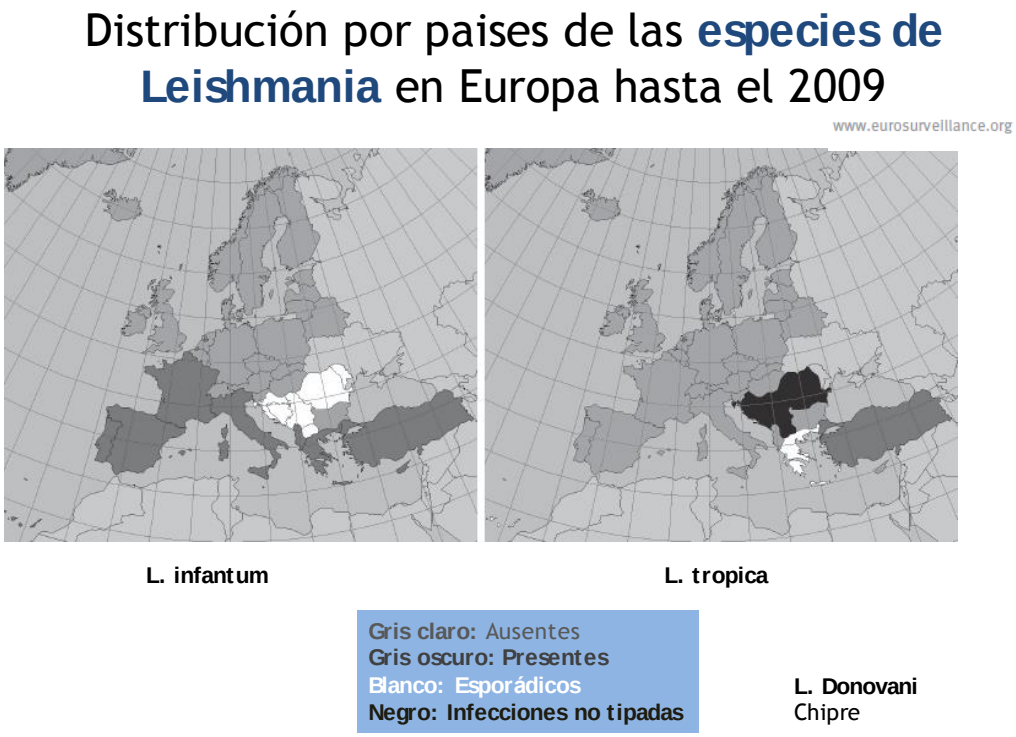
Figura 3. Biological department of Earham College. Picture of University East London.



En Europa existen dos ciclos de transmisión que se han demostrado, y que condicionan que esta enfermedad siga siendo endémica en Europa. Un ciclo de transmisión

zoonótico de leishmaniasis visceral y cutánea por L. *infantum*, y una transmisión antroponótica de leishmaniasis cutánea causada por L. *tropica* que se ha descrito con casos esporádicos en Grecia(12)(13). Esta última presenta un alto riesgo de expansión por el alto número de migrantes de la zona y viajeros.

Figura 4. Distribución de especies de leishmania en Europa, extraído de Eurosurveillance.org.



2.4 Brote de leishmaniasis visceral en el suroeste de Madrid

Desde el año 2009, se vino observando un notificación creciente de casos de leishmaniasis visceral en el suroeste de Madrid, confirmándose que se trataba del inicio del mayor brote nunca descrito en la cuenca Mediterránea, y por lo tanto de toda Europa. Este brote ha supuesto también el hallazgo de un nuevo reservorio (la liebre) y ha evidenciado un cambio en el patrón epidemiológico, ya que esta enfermedad que se asociaba a ámbitos rurales y con el perro como principal reservorio, cambia de patrón, localizándose los casos en una zona urbana.

La red de vigilancia epidemiológica ha notificado desde julio de 2009 hasta mayo de 2015, 644 casos que cumplen con la definición de "caso del brote comunitario" con una tasa de incidencia de 18,91 casos por 100.000 habitantes. De todos estos casos 510 eran residentes en Fuenlabrada, lo que equivale a una tasa de incidencia de 43,47. Desde que el brote ha comenzado, estos casos suponen un 76,5% de todos los casos declarados en la Comunidad de Madrid.

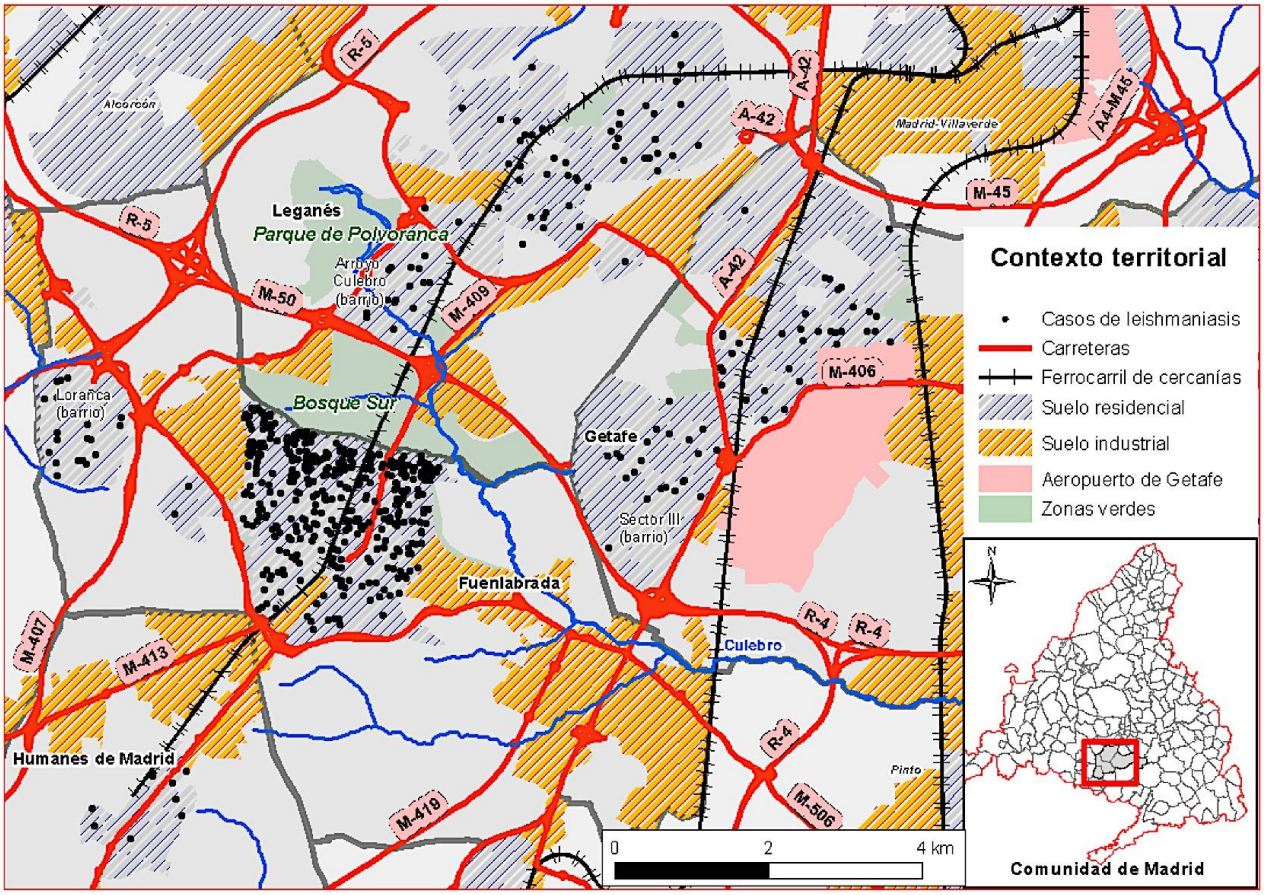
De todos los casos de leishmaniasis, en Fuenlabrada se han declarado 180 casos de leishmaniasis visceral y 354 de leishmaniasis cutánea.

Desde el inicio del brote, el número de casos fue aumentando hasta un pico máximo entre enero de 2011 y 2012. En los datos publicados por Arce at al (14) hasta el año 2013, se diagnosticaron 6 casos en 2009, 97 en 2010, 196 en 2011 y 147 en 2012.

Durante el brote se han observado anualmente una acumulación de casos entre el principio del invierno y el fin de la primavera que están relacionados con el ciclo de Phlebotomus, que tiene determinadas particularidades en nuestro país debido a las temperaturas (se amplía la información más adelante en el apartado del vector), y con el período de incubación de la enfermedad.

En cuanto a la distribución espacial, se puede observar en el mapa siguiente la proximidad de los domicilios a las zonas verdes donde están las liebres, y como todo este entorno se encuentra rodeado de vías de alta velocidad que limitan la movilidad de las liebres.

<u>Figura 5.</u> Mapa extraído del informe técnico de la dirección de Salud pública de la Comunidad de Madrid donde se observa la distribución de los casos según la residencia de los pacientes desde 2009-2015.

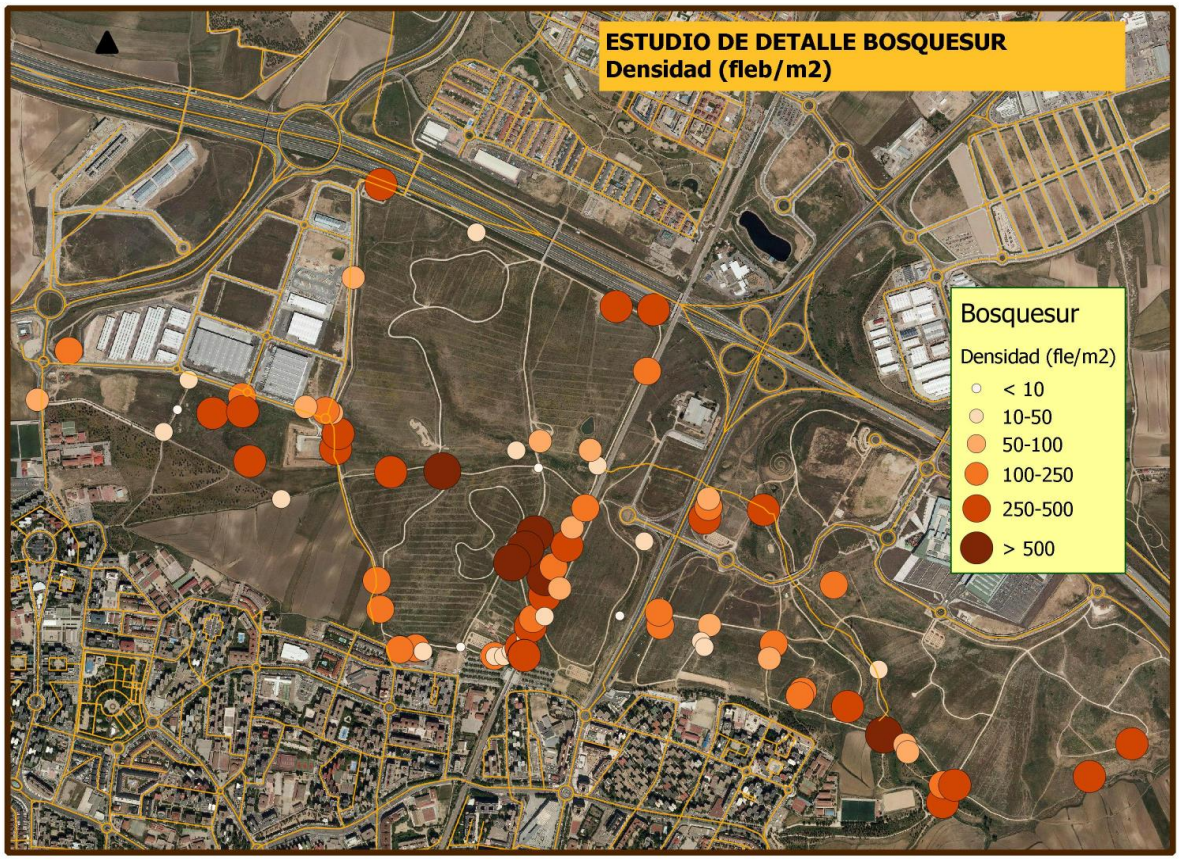


En el siguiente mapa se puede ver la distribución de Phlebotomus y como aumenta su densidad en las áreas colindantes con las zonas construidas y viviendas. La zona más

afectada es el norte de Fuenlabrada, sobre todo aquellas zonas adyacentes a espacios no construidos.

Así pues las densidades de flebotomos alcanzan niveles muy elevados de entre 200 y en ocasiones más de 500 flebotomos por m^2.

Figura 6. Distribución geográfica de la densidad de flebotomos en el área de Fuenlabrada.



Todas estas particularidades parecen explicar por qué se ha generado un brote de tal magnitud, ya que encontramos un aumento de densidad de los vectores, un aumento de un nuevo reservorio con alta capacidad de multiplicación y sin depredadores en la zona, y un núcleo urbano de gran tamaño a una distancia muy próxima.

Otro hecho diferencial del brote es que el serotipo encontrado es Leishmania *infantum* Lombardi (15), que aunque ya presente hace años en España en los años ochenta no era la cepa más prevalente. Finalmente, estudios ex vivo sugieren que las cepas aisladas en el brote podrían ser más virulentas (16).

3. Etiología: Parásito, ciclo, vector y reservorio

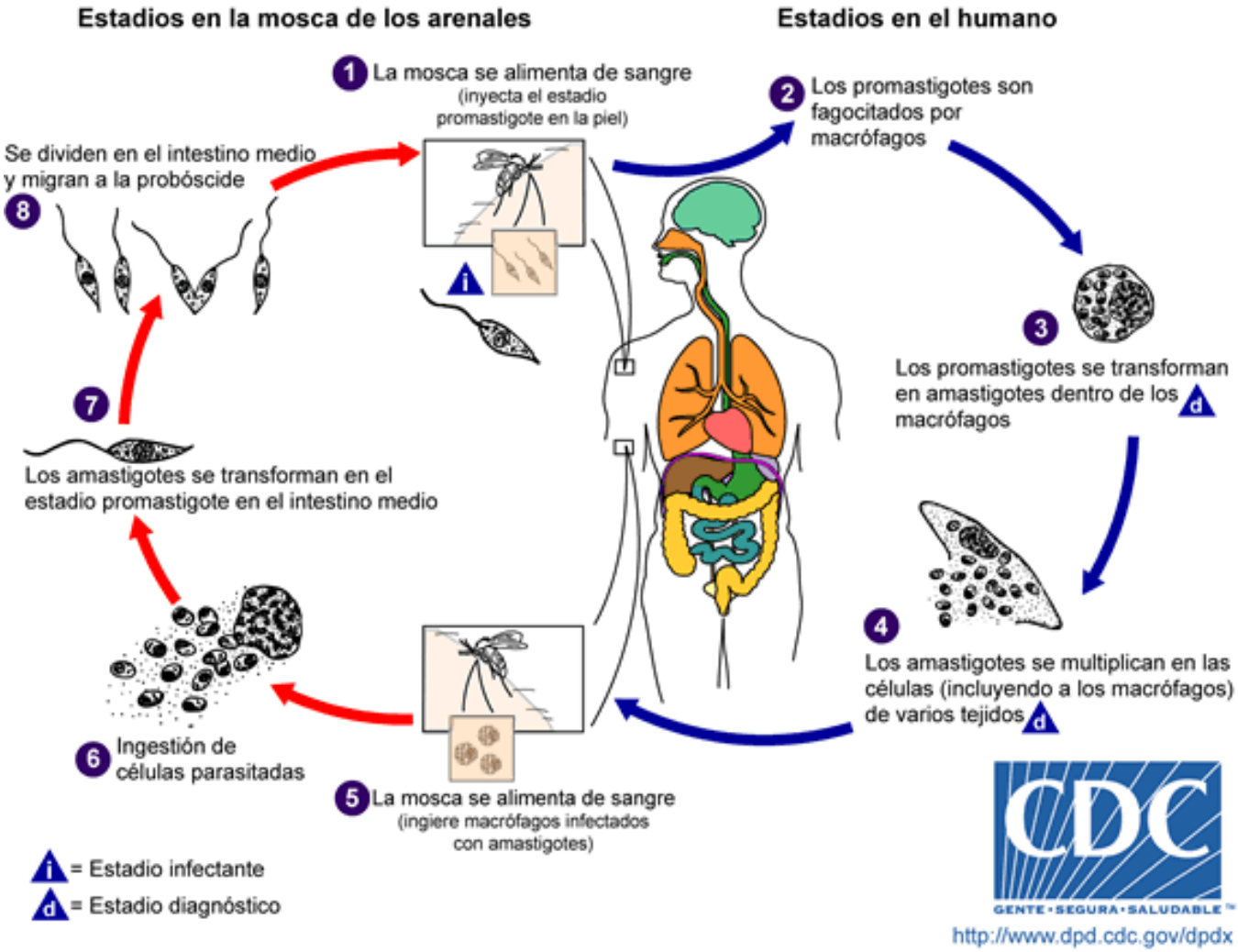
3.1 El parásito y su ciclo: Leishmania spp.

El género Leishmania está dividido en dos subgéneros según el desarrollo que presentan dentro de las hembras de Phlebotomo. Se clasifican como subgénero Leishmania si presentan un desarrollo prepilórico en los vectores, y como subgénero Viannia con desarrollo peripilórico. Como ya hemos comentado previamente, el subgénero Viannia está circunscrito al continente americano, mientras que Leishmania presenta una distribución mundial.

Leishmania presenta un ciclo dimórfico, con una fase sexual que todavía no ha sido descrita, y una fase asexual, que comienza con los promastigotes, que se encuentran en el aparato digestivo y las probóscides del vector, Phlebotomus. Ésta es una forma parasitaria elongada, flagelada, y por lo tanto móvil, que se trasmite a la piel y sangre del hospedador cuando Phlebotomus se alimenta. Después de la inoculación, los promastigotes son ingeridos por los macrófagos circundantes, transformándose en unas estructuras ovaladas intracelulares, llamadas amastigotes. Estos se encuentran dentro de unas estructuras llamadas fagolisosomas, donde se van multiplicando por división binaria, finalmente destruyendo las células, e infectando a otras células reticuloendoteliales. Los amastigotes se distribuyen por conductos linfáticos y sistema vascular, infectando más células mononucleares por todo el sistema reticuloendotelial(17). El ciclo se cierra cuando una hembra de Phlebotomus ingiere células

parasitadas. Una vez en el aparato digestivo del Phlebotomus, los amastigotes sufren una serie de cambios en diferentes estados intermedios, flagelados, convirtiéndose, al final, en promastigotes infectivos.

Figura 7. Ciclo de Leishmania extraído de la página web pública del Center for disease contro (CDC).



3.2 El vector: phlebotomus

Existen varios géneros de “sandflies” (moscas de la arena) que pican a los humanos, no obstante, los únicos vectores que se han demostrado implicados en la transmisión de la leishmaniasis son las especies y subespecies de Phlebotomus y Lutzomyia. Lutzomyia presenta una distribución prácticamente limitada al continente americano (relacionándose así con las enfermedades del Nuevo Mundo y el subgénero Viannia) y el género Phlebotomus con una distribución prácticamente mundial (18).

Las moscas de la arena presentan un ciclo que es poco conocido. Se sabe que el desarrollo de los huevos depende en parte de la temperatura, alargándose el periodo en lugares con temperaturas frías, y acortándose con temperaturas cálidas. Los huevos se desarrollan en la tierra, por lo que este tipo de moscas no presentan desarrollo acuático (19).

La etapa larval dura unas tres semanas y posteriormente salen de la pupa. Los machos no presentan una estructura lo suficientemente fuerte para atravesar la piel por lo que no se han implicado en la transmisión de enfermedades. Las hembras, sin embargo, precisan de sangre para poder desarrollar los huevos. Las preferencias de los vectores por diferentes vertebrados, depende de cada especie y de los diferentes hospedadores disponibles.

Las moscas de la arena suelen reposar en áreas oscuras y húmedas, pudiendo ser encontradas en habitaciones, nidos de pájaros, termiteros, agujeros en la arena, cuevas, etc… Dentro de las diferentes especies, existen aquellas que son exofágicas y exofílicas, lo que significa que se alimentan y desarrollan los huevos fuera de los nichos, mientras que hay otras especies que son endofílicas, y por lo tanto desarrollan los huevos en los nichos. Esto es de gran importancia para las estrategias erradicadoras, ya que a las especies endofílicas se las puede intentar exterminar en sus nichos, pero en las especies exofílicas y exofágicas, no se puede, ya que no se encuentra allí.

Todos estos condicionamientos, explican la compleja epidemiología de esta enfermedad, que depende de las características de cada especie, ambiente ecológico, localización de los nichos, etc (20).

Cabe destacar que aunque la mayoría de las transmisiones son vector-mediante, existen indicios de la posibilidad de trasmisión vertical de madre a hijo(21)(22)(23), el contagio a través de jeringuillas compartidas(24) y transfusiones sanguíneas, aunque como hemos mencionado, se tratan de modos de transmisión minoritarios.

En España se han identificado dos especies de Phlebotomus capaces de trasmitir esta enfermedad: Phlebotomus *perniciosus* y Phlebotomus *ariasi*, lo que condiciona la posibilidad de transmisión en toda la península si se dieran las condiciones adecuadas. Se ha observado que la distribución de las dos especies de Phlebotomus es ligeramente diferente, con una distribución que comprende la práctica totalidad de la península para el P. *perniciosus* (respetando la zona norte de la península: Galicia, Asturias, Cantabria y País vasco) y una distribución con dos áreas predominantes afectas (sur de Galicia y Castilla y León, así como el litoral mediterráneo y Badajoz) para P. *ariasi* (25).

Distribución geográfica de *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* en España

Phlebotomus perniciosus

Phlebotomus ariasi

Figura 8: Extraída de "Review of the Current Situation and the Risk Factors of Leishmania Infantum in Spain". Berta Suárez Rodríguez et al.

Se ha observado que el riesgo de transmisión también es diferente según el momento del día, ya que los flebotomos presentan una actividad principalmente nocturna cuando las temperaturas son ligeramente más bajas y con mayor humedad.

En varios estudios realizados para calcular la tasa de infección de los flebotomos, los datos muestran en España, una tasa de infección entre un 0,4 y 4,6% (25), mientras que durante el brote del Suroeste de Madrid de 2009 se describieron tasas más altas. En 2012 existía una tasa de parasitación de 2.4% que subió sólo un año después a 6.6%. Se realizaron varios estudios para observar la densidad de flebotomos en el área del brote, objetivándose, que la densidad era creciente: 16 moscas de arena/m^2 en 2008, 30 moscas de arena/m^2 en 2010 y 50 moscas de arena/m^2 en 2012 (14).

En España existen tres patrones de presentación clásicos, que incluirían el endémico (en el que hay casos esporádicos donde el perro actúa como reservorio), los casos asociados a situaciones de inmunodepresión en pacientes trasplantados, en tratamiento con fármacos biológicos o pacientes VIH positivos, y por último los brotes epidémicos.

Los factores descritos que condicionan brotes epidémicos o simplemente el aumento en el número de casos, están relacionados con el aumento de la presencia de flebotomos infectados. Son precisas tres condiciones epidemiológicas al mismo tiempo; presencia de flebotomos infectados, un animal que pueda actuar como reservorio, y que éstos estén en el mismo espacio. Si el espacio geográfico coincide con una zona urbana con muchos habitantes, se dan las condiciones necesarias para un brote(25).

3.3 El reservorio

El principal reservorio en España es el perro. La mayoría de éstos son asintomáticos (más de un 50%), pero presentan la misma capacidad de trasmitir la enfermedad, lo que condiciona que sean amplificadores del ciclo de trasmisión(26)(27).

Los estudios de seroprevalencia realizados muestran que hay perros con serología positiva para L. infantum por toda la Península e Islas, con una distribución por todo el territorio español. Donde está aumentada la cantidad de flebotomos y parásitos, la seroprevalencia aumenta y esto puede relacionarse con un aumento de casos, ya que aumentaría la probabilidad de exposición a un vector infectado (28).

Durante el brote en el sur de Madrid, entre los años 2011 y 2012, se realizaron pruebas de detección de leishmania en perros, mostrando una prevalencia canina de leishmania de aproximadamente un 5%. Como describe Arce A et al, se recogieron más de 1000 perros durante la campaña de vacunación de rabia y tras realizar rk39 como prueba de detección de leishmania, se observó una prevalencia del 1% en perros domésticos y 3.6% en perros callejeros. En 2012, se realizaron estudios similares en 561 perros, con una seroprevalencia estable de 1.6%(14).

Estos hallazgos condicionaron que se realizaran estudios de otros potenciales reservorios como gatos, ratas, conejos y liebres, ante falta de evidencia de perros infectados. De los estudios realizados (ver Tabla a continuación), llamó la atención la prevalencia de leishmania de aproximadamente un 30% en las liebres y conejos. Estudios posteriores han encontrado que la liebre es reservorio de Leishmania en otras zonas de España (29) y estudios de xenodiagnóstico directo han demostrado que pueden transmitir el parásito a los flebotomos tanto las liebres(11) como los conejos (30).

Tabla 3. **Prevalencia de Leishmania en Fauna silvestre (PCR +)**

Animal	Número de muestras				Positivas (%)			
	2011	2012	2013	2014	2011	2012	2013	2014
Liebres	33	142	61	55	11 (33,3%)	37 (26,1%)	20 (32,8%)	19 (34,5%)
Conejos	22	55	131	88	3 (13,6%)	4 (7,3%)	34 (26%)	29 (33%)
Gatos	68	50	50	-	4 (5,8%)	3 (6%)	6 (12%)	-

Extraída de Documentos Técnicos de Salud Pública. Leishmaniasis en la comunidad de Madrid. Subdirección de promoción de la salud y prevención. Dirección General de Atención Primaria. Junio 2015.

Esta condición de aparición de nuevo reservorio, actúa como un factor de reemergencia de enfermedades vectoriales, ya que favorece su diseminación. La implicación de este reservorio, que donde habita (el suroeste de Madrid), no tiene prácticamente depredadores, así como la cercanía a zonas residenciales y parques donde transita gran cantidad de población, ha facilitado que el brote alcance una gran magnitud.

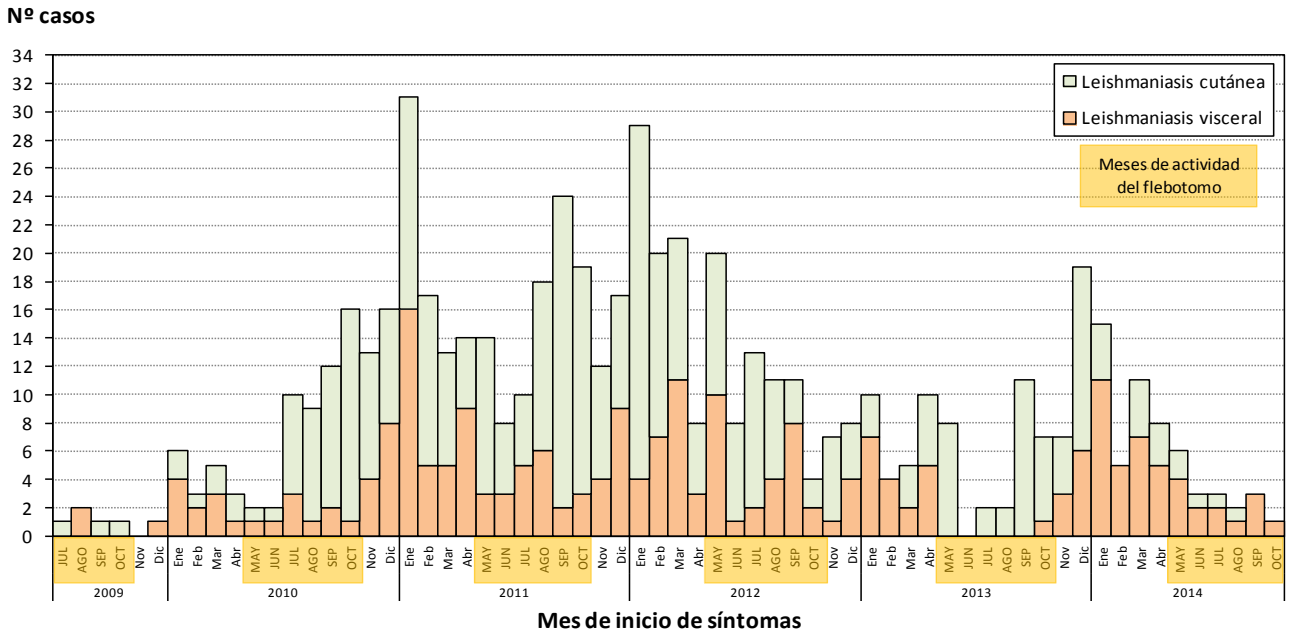
3.4 Fluctuaciones en la incidencia y periodicidad de los brotes

Dentro de la epidemiologia de la leishmaniasis, existen grandes fluctuaciones en la incidencia, es decir, en la cantidad de nuevos casos de leishmania que se registran a lo largo de un periodo de tiempo. Esto es debido a varios factores; como factores climáticos, movimientos poblaciones, la variación en las poblaciones de vectores y reservorios, etc… pero sin duda, el factor más importante involucrado en esta variabilidad, es el ciclo anual de los vectores.

Este ciclo, varía dentro de cada especie, y en países con climas tropicales se pueden encontrar moscas de arena durante todo el año. Phlebotomus *perniciosus* presenta una actividad que varía con la altitud y la latitud. Es una especie zooantropófila, y su actividad

comienza en febrero y termina en diciembre. En las zonas del norte de España, el periodo de actividad varía ligeramente, comenzando en mayo y acabando en noviembre.

Gráfico 1. Brote comunitario de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. 2009-2014.
Curva epidemiológica según forma de presentación, por mes de inicio de síntomas (actualizada a 07/11/2014).



Debido a esta variación en función de altitud y latitud, en España, los periodos con más riesgo para la trasmisión son junio y julio, pero también finales de septiembre y principios de octubre.

Durante el brote declarado desde 2009, hemos podido observar una relación temporal, pudiendo observar, que aunque hemos tenido casos durante todo el año, existe un claro pico de nuevos casos entre los meses de diciembre, enero y febrero. Como se puede observar en el Grafico 1, los meses de mayor actividad del flebotomo coinciden con los meses de verano, desde mayo a octubre, con la aparición de un pico de casos unos meses después, en probable

relación con el periodo de incubación, que en la literatura se objetiva que tiene un rango muy amplio, entre 1 mes y dos años.

4. Patogenia

La leishmaniasis presenta una patogenia similar a otras infecciones intracelulares como la lepra o la tuberculosis. Al producirse la infección se pone en marcha el sistema inmunitario que en función de diferentes factores que todavía no han sido completamente clarificados, presenta una respuesta u otra, pudiendo en última instancia contener la infección, o por el contrario, que se disemine, provocando la leishmaniasis visceral.

En la leishmaniasis visceral es raro encontrar lesiones cutáneas ni amastigotes en la piel. Se produce una invasión del bazo y el hígado, así como de nódulos linfáticos y médula ósea. Existen varios factores implicados en el desarrollo de una respuesta u otra, uno de los más importantes es la malnutrición (31), que favorece el desarrollo de una respuesta inmunitaria inadecuada, favoreciendo el progreso a leishmaniasis visceral (32).

La respuesta celular asociada a un buen control de la infección desarrolla una proliferación de linfocitos T CD_4^+, con una respuesta a través de la vía Th_1 que sintetiza Interferón-γ e IL-12 (33)(34). Estas dos citoquinas son de vital importancia para desarrollar una buena defensa contra la infección, y los estudios de laboratorio sobre modelos murinos han objetivado que en la enfermedad diseminada se encuentran ausentes.

El Interferón-γ activa a los macrófagos para la destrucción de los parásitos en los fagolisosomas, a través de la producción de óxido nítrico, por una vía L-arginina dependiente, y activando mecanismos oxidativos (35).

Cuando no se desarrolla la vía de respuesta Th_1 porque se encuentra inhibida, la enfermedad progresa, presentándose clínicamente como leishmaniasis visceral. En estudios in-vitro frente a antígenos de leishmania, se ha visto que no se sintetizan Interferón-γ ni IL-12, y las células mononucleares no se desarrollan. Sin embargo, durante la leishmaniasis visceral sí se producen una gran cantidad de anticuerpos contra leishmania, pero el problema es que no son activos y no confieren protección. Esta respuesta ineficaz, se ha vinculado a la producción de una activación policlonal de células B, y a un aumento de síntesis de TGF-β e Il-10.

De manera general consideramos que la vía de respuesta Th_1 se relaciona con una respuesta inmunológica celular, mientras que la respuesta Th_2 desencadena una respuesta humoral muy potente, pero que acaba siendo ineficaz. En la realidad existen estudios que muestran que las respuestas son mucho más complejas de lo que se pensaba, con citoquinas sintetizadas por ambas vías que tiene acción protectora y que interactúan unas con otras.

En la vía Th_1, como ya he mencionado, se produce un aumento de síntesis de IL-12, por macrófagos, pero también es sintetizada en grandes cantidades por células dendríticas. La IL-12 (favorecida a su vez por la síntesis de IL-18), activa las células Natural Killer (NK) que producen una liberación temprana de interferón-γ activando la respuesta inmunitaria innata, y posteriormente favoreciendo un viraje hacia una respuesta Th_1. La principal fuente de interferón-γ son los T CD_4^+, pero se ha observado que los T CD_8^+, pueden tener un papel principal en dicha síntesis, en las infecciones por L.*major*, L.*donovani* y L.*amazonensis* (36).

La respuesta Th_2, vinculada con la producción de IL-4, está asociada a un mal control de la enfermedad, y como hemos comentado previamente, favoreciendo una evolución a leishmaniasis visceral (37). En los estudios iniciales, se creía que esto era debido a que se producía un respuesta IL-4 mediada y una contraregulación de la respuesta inmune que

frenaba la respuesta Th_1 mediada. En estudios recientes, se ha demostrado que esto no es exactamente así, y que la enfermedad evoluciona de esta manera por una incapacidad para que se active la vía Th_1 como resultado de una incapacidad de producir IL-12 ni de responder a ella. Y este hecho es independiente de que la respuesta Th_2 esté o no activada.

Aunque se sabe que la IL-4 puede inhibir la producción de IL-12, estudios recientes han demostrado que existen otros mecanismos, IL-4 independientes que puede producir esta disminución de IL-12, y de hecho, estudios en modelos murinos deficientes en IL-4, demostraron que se podía generar una respuesta Th_2 sin que exista producción de IL-4, lo que claramente demuestra otros mecanismos implicados en la activación de la vía Th_2.

La leishmaniasis visceral, presenta una presencia de mezcla de citoquinas de las vías Th_1/Th_2, detectándose tanto Interferón-γ como IL-4 o IL-13. De hecho, se han encontrado ambas respuestas (Th_1 y Th_2) con síntesis tanto de Interferón-γ como de IL-4 en paciente curados.

Esto pone de manifiesto que la regulación de la respuesta inmunitaria en la leishmaniasis visceral es muy compleja, e interactúa de numerosas formas, todavía muchas, hoy por descubrir. Evidenciándose también las diferentes respuestas según cada especie, que probablemente condicione en el futuro, abordajes terapéuticos diferentes (38).

5. Manifestaciones clínicas: Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral cursa con afectación de diversos órganos internos. A diferencia de las presentaciones cutáneas, existe una afectación principalmente del hígado, el bazo y la médula ósea, que explican los síntomas y hallazgos más frecuentes.

Cabe destacar, que tradicionalmente, se ha incluido dentro de las presentaciones viscerales, la leishmaniasis ganglionar. En nuestra experiencia, durante el brote de leishmaniasis del suroeste de Madrid, se diagnosticaron 28 pacientes con adenopatías, pero sin ningún síntoma sistémico. Estos pacientes evolucionaron de manera excelente, incluso con 3 pacientes que se curaron espontáneamente, y el resto presentando buena evolución con dosis más bajas de anfotericina B liposomal que para leishmaniasis visceral clásica (entre 10 y 21 mg/kg) y sin recurrencias (39). Esto plantea la necesidad de realizar nuevos estudios dado que parece presentar una evolución más benigna y más parecida a la leishmaniasis cutánea. Excluyendo estos casos de nuestra casuística de leishmaniasis visceral, la presentación clínica es similar a la descrita en la literatura, con algunas particularidades que serán desarrolladas más adelante en el apartado correspondiente.

La leishmaniasis visceral presenta una clínica similar en todas las áreas endémicas. El periodo de incubación es muy variable, y aunque lo más habitual es que comprenda entre 2 a 8 meses, están descritos periodos de incubación más cortos de hasta 10 días, y también más largos, hasta 2 años después de la exposición. En el caso de haber estado expuesto, cabe la posibilidad de desarrollo de síntomas años después, si existe alguna circunstancia que conlleve una inmunodepresión (40).

Se han descrito casos de reactivación de leishmania en pacientes que desarrollan SIDA, en pacientes sometidos a tratamiento inmunodepresores como metotrexato, corticoides y anti TNF, y también en pacientes que han necesitado ser trasplantados (41)(42). Por este

motivo, todo paciente que haya nacido, viajado o residido en zona endémica de leishmaniasis, tendría la potencialidad de desarrollar la enfermedad si estuviera expuesto a un agente inmunosupresor.

La presentación típica es una aparición subaguda o crónica de debilidad generalizada, fiebre, pérdida de apetito y de peso. La fiebre suele ser intermitente, descrita clásicamente como bien tolerada (43). En algunos casos de desarrollo de la clínica de meses de evolución, puede encontrarse distensión abdominal secundaria a hepatoesplenomegalia. Esta presentación clínica insidiosa, condiciona que en países más pobres o con menor acceso a atención sanitaria, los pacientes tarden mucho en consultar, retrasándose mucho el diagnóstico.

Las personas con una presentación aguda, con inmunidad afectada, ya sea por cualquier causa, suele presentar un inicio muy agudo de los síntomas, con fiebre muy alta, escalofríos, y una periodicidad que en zonas endémicas puede confundirse con malaria.

Se produce una hepatoesplenomegalia que a la exploración es blanda y no dolorosa, y en ocasiones puede llegar a ser muy llamativa. En países donde existen altas tasas de malnutrición, no es difícil observar edemas, sobretodo en niños. En los casos más avanzados en los que no se ha entrado en contacto con servicios médicos y la enfermedad está muy avanzada, se puede observar sangrado a diferentes niveles, con predominio de epistaxis, sangrado gingival y petequias en extremidades.

Las muertes se producen sobretodo en países con bajo nivel de acceso a atención sanitaria o en pacientes que han presentado una larga evolución clínica. La causas principales de muerte se deben principalmente a sobreinfecciones bacterianas (sobretodo neumonía y sepsis), tuberculosis, y también a desnutrición o hemorragias secundarias a la pancitopenia (44).

En las pruebas de laboratorio se observa anemia, leucopenia y trombocitopenia. Destaca también una hipergammaglobulinemia (45) y en nuestra experiencia, hay una elevación muy importante de ferritina (>1000 μg/l) como reactante de fase aguda, con valores muy elevados que pocas enfermedades presentan, y que podrían ayudar en un diagnóstico diferencial.

La anemia está prácticamente presente siempre y es normocítica y normocrómica. Se cree que es debida a varios factores, entre ellos a cierto grado de hemólisis, secuestro en el bazo e inhibición de su producción a nivel medular. La neutropenia se encuentra también presente en casi todos los casos, se cree que pueda haber un secuestro a nivel esplénico y cierto componente autoinmune todavía no clarificado.

A nivel analítico se pueden encontrar transaminasas elevadas y elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG) así como la proteína C reactiva (PCR).

Existen manifestaciones más atípicas de las que hemos tenido casos en nuestra serie, con afectación renal por aparición de glomerulonefritis por inmunocomplejos(46), presentaciones mucocutaneas típicas de otras especies (47), e incluso presencia de parásitos en colon, mucosa esofágica y pulmón.

6. Técnicas diagnósticas de Leishmaniasis visceral para L. infantum

Existen varias técnicas diagnósticas para la leishmaniasis visceral que dependiendo de la zona y la expresividad clínica, situación inmunitaria, etc… presentan unas sensibilidades y especificidades ligeramente diferentes.

Según la OMS/WHO, el diagnóstico de un caso de leishmaniasis visceral implica la presencia de clínica (fiebre irregular prolongada, esplenomegalia y pérdida de peso) asociado a la positividad de una técnica serológica (IFAT, ELISA, rK39 o test de aglutinación directa)

o la demostración del parásito por visualización del mismo o por detección de DNA por una técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction).

Las técnicas parasitológicas tienen como objetivo demostrar la presencia de parásitos en los tejidos. Los principales tejidos elegidos para la visualización de los parásitos son el aspirado medular (48) y el tejido esplénico (49). También pueden llegar a visualizarse parásitos en biopsias de adenopatías (50), hígado, e incluso en sangre periférica, sobre todo en pacientes VIH positivos con altas cargas parasitarias (51).

En nuestro medio, el aspirado de médula ósea es la muestra más habitual. Se observan los amastigotes, que son redondos, de unos 2-3 μm, que se pueden observar en el interior de los macrófagos y monocitos. La sensibilidad de esta técnica, según la diferente literatura, oscila entre un 40-85% (52). Estas sensibilidades aumentan de manera muy significativa si la muestra es de tejido esplénico, ya que este es lugar donde existe mayor presencia de parásitos, pero la alta morbilidad (y en ocasiones mortalidad) de esta técnica ha condicionado que en Europa se prefiera realizar aspirado medular.

No obstante, en la literatura existente, la tasa de complicación tras punción esplénica no es tan alta (menos de 0,1%), con sensibilidades superiores al 95%, siempre y cuando la coagulación sea normal (> 40.000 plaquetas y tiempo de protrombina > de 5 s el control) y sea realizada por personal formado (49).

El cultivo de las muestras obtenidas aumenta la sensibilidad, pero son necesarias semanas para obtener el diagnóstico. Dos o tres gotas del material (aspirado medular, esplénico o adenopático) se inocula en medios de crecimiento, y es mantenido a 22- 28ºC. Se analiza semana a semana la presencia de promastigotes, y si a las 4 semanas no se objetiva crecimiento de parásitos, se da como resultado negativo.

Uno de los métodos más utilizado en el momento actual es la PCR, siendo actualmente la técnica de referencia en nuestro medio, y aunque puede detectarse en cualquiera de los órganos afectos, es muy rentable en sangre periférica (53). La realización de este tipo de test en buffy coats (preparados a partir de un centrifugado de sangre total) en vez de realizarlos en una muestra de sangre completa, se observó que aumentaba la sensibilidad de manera sustancial.

Se ha intentado utilizar la PCR como prueba diagnóstica para diferenciar una nueva infección de una recaída, y como test de cura, con resultados variables (54)(55). En pacientes con PCR positiva tras tratamiento, es más probable el desarrollo posterior de una nueva recaída, pero el hallazgo de pacientes con PCR persistentemente positiva que no desarrollan síntomas sugieren una limitación a este respecto, y se ha especulado con que esta positividad esté ligada a una persistencia del parásito pero en una forma no viable, de modo que no condiciona enfermedad.

El gold standard del diagnóstico son los métodos parasitológicos, pero dado que precisan de largo tiempo (como el cultivo en medio NNN) o de especialistas entrenados (como la PCR o la visualización de los parásitos), se intenta avanzar en la utilización de técnicas serológicas más fáciles de realizar, y con porcentajes aceptables de sensibilidad y especificidad.

Dentro de las técnicas de inmunodiagnóstico, tenemos aquellas basadas en la detección de antígeno, y aquellas que detectan el anticuerpo. Aquellas técnicas basadas en la detección de antígenos presentan una mayor sensibilidad que las que detectan anticuerpos ya que existen enfermedades o estados inmunitarios que condicionan una baja producción de anticuerpos, por ejemplo, el VIH, lo que hace que se hayan descrito sensibilidades más bajas en estos pacientes con estas técnicas(56)(57). Además presentan en ocasiones falsos positivos

o positivos cruzados con enfermedades muy prevalentes en áreas endémicas (como tuberculosis, Chagas, etc…), y en ocasiones precisan de condiciones de laboratorio caras y sofisticadas.

Se han desarrollado técnicas para la detección de fracciones polipeptídicas de leishmania en orina con resultados muy variables. Se han descrito en la literatura una sensibilidad entre 65-96% y una especificidad del 100% en la técnica de látex en orina (KATEX)(58), pero hacen falta mayores estudios en esta línea ya que solo se han realizado 6 estudios en total(58)(59)(60), con unos resultados globales de una sensibilidad del 63.6% (95% IC 40.9 a 85.6) y una especificidad del 92.9% (95% IC 76.7 a 99.2) según fuentes de Cochrane(61). Los estudios realizados en el este de África e India, confirman una sensibilidad del test baja, por lo que se necesita desarrollar más la técnica.

Dentro de las técnicas para la detección de anticuerpos cabe mencionar la detección mediante aglutinación directa (DAT), que es una técnica sencilla y se ha utilizado en determinados laboratorios en áreas endémicas (62)(63), por ejemplo por parte de Médicos Sin Fronteras en Sudán(64)(65). Si los pacientes presentaban altos títulos, se les proporcionaba directamente tratamiento, y si presentaban títulos bajos, se procedía a realizar estudios parasitológicos. Los diferentes estudios realizados cifran la sensibilidad de esta técnica entorno a un 91-100% con una especificidad de un del 72-100%. A pesar de los buenos resultados, el hecho de su baja reproducibilidad entre diferentes estudios y falta de homogenización a la hora de la interpretación de los resultados, la fragilidad del antígeno y la necesidad de cadena de frío, la hacen una técnica cada vez menos usada.

La IFAT (inmunofluorescencia indirecta) es la técnica serológica de elección para el diagnóstico en pacientes inmunocompetentes en áreas con recursos, mostrando sensibilidades

de 89-91% y especificidades de entorno un 100%(66)(67).

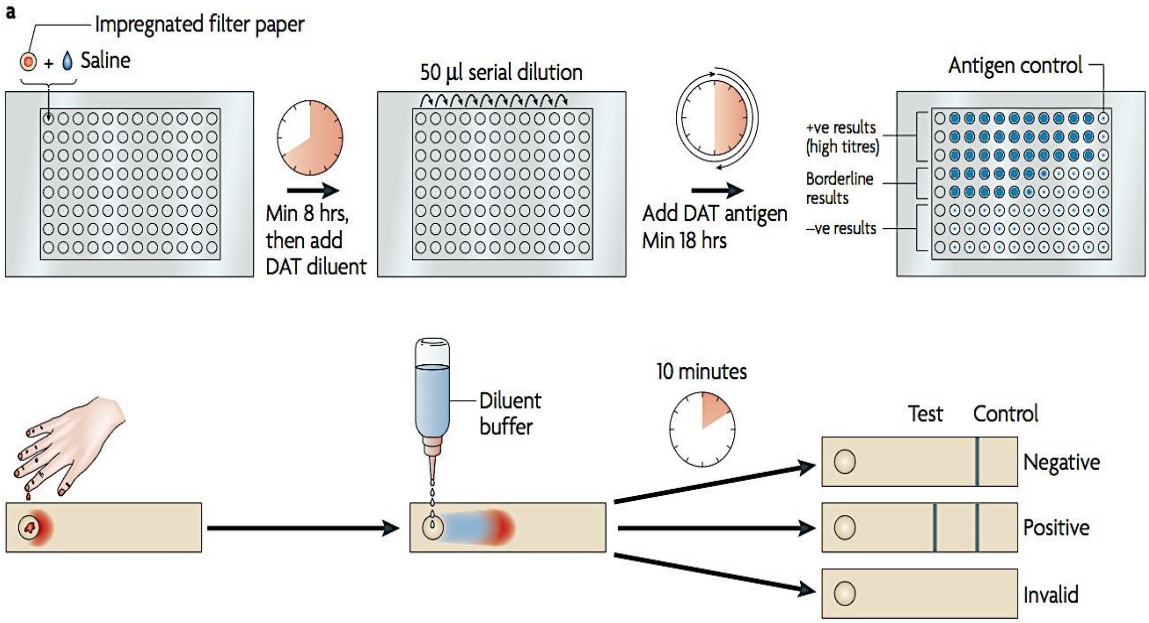
Otra técnica serológica utilizada es un análisis mediante ELISA con un antígeno soluble (CSA), que es el más comúnmente utilizado, con sensibilidades que van desde un 80 a un 100%, pero con problema de reacciones cruzadas muy frecuentes con enfermedades endémicas de países con alta prevalencia de leishmania como tuberculosis, tripanosomiasis y toxoplasmosis.

Ante la dificultad de realización de ciertas técnicas y la necesidad de personal cualificado, se han estado realizando diferentes estudios para desarrollar otras técnicas, que puedan ser fáciles de realizar, baratas y estandarizadas. Dentro de este tipo de técnicas hay que destacar la utilización de la proteína recombinante rk39 de L. chagasi que se ha utilizado para crear test inmunocromatográficos y a través de técnicas de ELISA para diagnóstico rápido y fiable de la leishmaniasis visceral.

En un metanálisis realizado por Zuinara et al(66), tras analizar 13 estudios con más de 5.500 pacientes incluidos, estos autores concluyen que el análisis de la proteína rk39, ya sea con un " strip test" o mediante ELISA, así como la aglutinación directa (DAT), son las mejores técnicas actuales de las que disponemos para el serodiagnóstico de la leishmaniasis visceral.

En situaciones de dificultad técnica en el terreno, el uso de "strip test" es de gran utilidad, ya que resulta fácil de usar; hay que colocar 1-2 gotas de sangre del paciente y cuando se observan dos bandas de reactivas (una de control y la otra diagnóstica), como se puede observar en la imagen inferior, se puede considerar resultado positivo. Es un test barato (1-1.5 dólares) y puede ser realizado e interpretado por personal no médico, lo que le convierte en una técnica muy valiosa para numerosos países.

Figura 9. Técnica de rápida de rK39 y DAT extraído del artículo de Chappuis et al. en " Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?"



Como conclusión, la herramienta diagnóstica a utilizar ha de ser elegida en base a las características del medio en el que nos encontramos, dependiendo del tipo de laboratorio al que podemos acceder, y siempre teniendo en cuenta la clínica y características del paciente, de manera que podamos valorar los resultados de manera precisa y valorar en función de esto, si se precisan pruebas más invasivas, si los resultados son fiables a la hora de descartar la posibilidad de diagnóstico, o si por el contrario, al recibir un resultado negativo hay que ir más allá.

En nuestro contexto, hemos podido observar que durante los años que ha durado el brote, el proceso diagnóstico ha ido cambiando, al haber reconocido que nos encontrábamos

en un momento de alta endemicidad de leishmaniasis, esto se detallará más adelante en el apartado de resultados.

7. Tratamiento de Leishmaniasis visceral por L. infantum

Según el informe de la OMS/WHO de 2010 con respecto al tratamiento de la leishmaniasis visceral, no se debe tratar a ningún paciente hasta que no tenga un diagnóstico confirmado de leishmaniasis (6).

Existen diversos tratamientos aprobados para el tratamiento de la leishmaniasis visceral, y según el área donde estemos trabajando y las características clínicas de los pacientes habrá que utilizar uno u otro tratamiento. En las últimas décadas también han comenzado a preocupar la aparición de resistencias a determinados fármacos y se están realizando estudios que evalúan la posibilidad de terapias combinadas para reducir las tasas de resistencias(68)(69).

La primera droga utilizada para éste propósito, y que sigue siendo de primera línea en muchos casos, son los antimoniales pentavalentes. Existen dos tipos disponibles, el antimoniato de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam ®). Son medicaciones que se puede utilizar por vía intramuscular, intravenosa o intralesional en la leishmaniasis cutánea.

Son una familia de medicamentos que no son bien tolerados por la alta tasa de efectos secundarios. La inyección intramuscular es extremadamente dolorosa por lo irritante de la sustancia y la necesidad de inyectar altas cantidades. Los pacientes presentan de manera frecuente, náuseas, vómitos, dolor abdominal, mialgias y dolor de cabeza. Se han descrito efectos secundarios importantes como prolongación del QT y otras alteraciones

electrocardiográficas, elevación de enzimas hepáticas y lipasa, así como anemia y trombopenia(70)(71).

El principal problema de los antimoniales, además de los efectos secundarios, es la aparición de zonas con alta resistencia, por ejemplo en algunas zonas de India (estado de Bihar) y Nepal, donde la tasas iniciales de curación de los antimoniales que solían ser de > 90% en las últimas décadas ha bajado a menos de un 40% en determinadas regiones. Hasta hace unos años, no se sabía exactamente el porqué de este descenso, y parecía no estar directamente ligado a la resistencia del parásito, pero durante los últimos años se han ido identificando los diferentes mecanismos de resistencia intraparasitaria que parece estar en relación con enzimas que disminuyen de manera intracelular la cantidad del fármaco(72)(73). Aun así, parece que aumentando la dosis y el tiempo de administración, se aumenta la posibilidad de éxito terapéutico. Teniendo en cuenta estos datos, los antimoniales pentavalentes siguen siendo de primera línea en casi todo el mundo.

En España en los últimos años se consideraba de primera línea dicho tratamiento, a una dosis de 20 mg/kg /día intravenoso o intramuscular durante 28 días con un máximo de 850 mg/día de tratamiento, aunque esta limitación ha sido discutida en algunos estudios(74). Actualmente se utiliza de manera más habitual el tratamiento con Anfotericina B liposomal, sobretodo en paciente con mucha inmunosupresión o patologías que contraindiquen los antimoniales por sus efectos secundarios.

La segunda droga recomendada, y de amplia utilización, es la Anfotericina B deoxicolato (Abelcet ®). Durante la década de los 90, se realizaron múltiples estudios que cifraban la tasa de éxito del tratamiento entorno a 98-100% y un 92% tras fallo de primera línea con antimoniales. Durante este tiempo se han realizado estudios para intentar hallar la

menor dosis efectiva y regímenes de administración que favorecieran la realización del tratamiento completo (75). Tras muchos estudios, se comprobó que la dosis de 0.5 mg/kg/día era suficiente (se había comenzado con dosis que doblaban esta cifra) y se observó que con 14 días de tratamiento a días alternos, la tasas de curación no variaban (76).

No obstante, en Europa, la anfotericina deoxicolato ha sido rápidamente sustituida por Anfotericina B liposomal que presenta menores efectos secundarios, aunque es mucho más cara. La anfotericina deoxicolato presenta efectos secundarios frecuentes como escalofríos y fiebre durante la infusión, flebitis e insuficiencia renal que son menores en su presentación liposomal, que presenta mejor tolerancia.

En países con alta tasa de resistencia a antimoniales como son India y Nepal, se utiliza frecuentemente como primera línea la anfotericina deoxicolato, por su eficacia y menor coste, a unas dosis de 0.75–1 mg/kg en unas 15–20 infusiones, diariamente o a días alternos.

En Europa, la medicación más utilizada como primera línea es la Anfotericina B liposomal (Ambisome®). Sobre las dosis a utilizar, existen numerosos estudios que han estudiado la dosis mínima eficaz y diferentes pautas.

Existen estudios realizados en la India, en Kenia, Sudán y sur de Europa con resultados variables(77)(78)(79). Parece deducirse por los resultados que en el área de la India y Nepal, dosis bajas (unos 15mg/kg en total durante 3-5 días) ofrecen una tasa de éxito cercana al 100%, e incluso en dosis única de 10 mg/kg con una ausencia de enfermedad a los 6 meses en el 95-96% de los pacientes. Estos buenos resultados no parece que puedan obtenerse en el Este de África, donde los estudios con dosis que ofrecían buenos resultados en India (20 mg/kg) , no llegan a un 88% de curación y si se baja la dosis a 12 mg/kg, no se llega al 50% de curación (78).

En la cuenca Mediterránea se han realizado estudios con dosis de entre 3-5 mg/kg/día hasta 20 mg/ kg. Existen estudios tanto en Grecia como en Italia, donde se observan tasas de curación de entre un 95-100%, incluso con pautas de tratamiento corto de dos días con una dosis total de 20 mg/kg (80)(81).

Dada la aparición de resistencias, se han realizado diversos estudios para encontrar nuevas drogas que sean útiles. De entre ellas cabe destacar la paramomicina, miltefosina, la pentamidina y algunos derivados de los azoles.

La paramomicina es un aminoglucósido que se ha testado sobretodo en la India. Tiene un perfil de seguridad aceptable, con efectos secundarios que incluyen ototoxicidad reversible en un 2%, elevación de transaminasas y dolor en la zona de inyección, ya que se administra principalmente de manera intramuscular(82).

En estudios realizados en India, se ha observado que dosis de 15 mg/kg de sulfato de paramomicina durante 21 días consiguió tasas de curación de entre un 93-95% (83).

Curiosamente, una vez más, en el este de África, incluso con una dosis aumentada a 20 mg/kg, sólo se consiguieron tasas de curación de entorno un 85% con una duración también de 21 días (84). Existen bastantes estudios de terapia combinada, donde la adicción de paramomicina, mejora las tasas de curación frente a la administración única, por ejemplo, de antimoniales(85)(86). Esta droga no ha sido testada en al Área Mediterránea, y de hecho en España es muy difícil de conseguir.

La miltefosina comenzó a estudiarse hace unos 10-15 años, con la ventaja fundamental de ser la primera droga para la leishmaniasis visceral que podía administrarse por vía oral. Se ha realizado estudios en la zona de la India y Nepal así como en el Este de África,

confirmándose la eficacia en varios estudios, pero con limitaciones (87). El principal problema derivado de la utilización de este medicamento estriba en la aparición de recidivas. En estudios realizados en India, se observó una tasa aceptable de curación (94-97%) con dosis orales de 2.5 mg/kg/día durante 28 días (88) e incluso con tratamientos más cortos (89)(90). El hecho de que se administre oralmente supone la posibilidad de que, tras una mejoría clínica inicial, los pacientes dejen de tomar el tratamiento y por lo tanto fracasen en la curación, aumentando también la posibilidad de resistencias y recaídas.

En estudios realizados en el norte de Etiopía, se observaron tasa de éxito aceptables para inmunocompetentes, pero en pacientes VIH, la tasa inicial de cura fue de un 78% aproximadamente (91). Debido a todo esto la miltefosina es sobretodo utilizada en terapia combinada, donde mejora los resultados y disminuye la posibilidad de desarrollo de resistencias. La miltefosina es tolerada aceptablemente, como efectos secundarios principales, se describen náuseas y anorexia, así como diarrea, pero todos estos síntomas, mejoran a la largo de la toma del tratamiento (92). Cabe destacar que la miltefosina es muy teratogénica, por lo que hay que asegurar la contracepción en pacientes que tomen este tratamiento hasta 3-5 meses después de la finalización del tratamiento (93). Como ocurre con la paramomicina, no existen estudios realizados en el Área Mediterránea.

La pentamidina es una medicación de uso limitado dados sus efectos secundarios. Se administra en infusión e intramuscular, y se ha utilizado como tratamiento de segunda línea en la india en el estado de Bihar para tratar leishmaniasis visceral así como en áreas del este de África para tratar leishmaniasis visceral resistente y recidivas (94)(95). A lo largo de los años se ha objetivado una descenso de su eficacia, lo que unido a sus efectos secundarios graves como diabetes mellitus insulin-dependiente, shock, hipoglucemia e incluso

fallecimientos en relación con el tratamiento, hace que sea una droga que prácticamente ya no se utiliza (96).

Se han intentado esquemas con tratamientos orales con alopurinol y diferentes derivados azólicos (fluconazol, itraconazol, etc…) con resultados diversos sin que en el momento actual haya una evidencia que justifique su uso (96).

Dado el número no desdeñable de recidivas que presenta la leishmaniasis, así como casos de resistencia o incapacidad para conseguir curar un primer episodio de leishmaniasis, se están realizando numerosos estudios para comprobar si la pautas de terapia combinada presentan mejores resultados que en monoterapia. Todos los estudios actuales han sido realizados en India y Este de África, y por lo tanto en leishmaniasis visceral por L. *donovani*, sin poder extrapolarse estos resultados a la Cuenca Mediterránea, donde el menor número de casos dificulta la realización de estudios propios.

Los objetivos de las terapias combinadas son reducir la duración del tratamiento, y por lo tanto, mejorar el perfil de toxicidad, reduciendo efectos secundarios indeseables y mejorando la tolerancia y el cumplimiento terapéutico.

Es también muy importante reducir los costes de los tratamiento, ya que un gran número de los pacientes viven en países con grandes dificultades económicas para costear estos tratamientos. Por último, se intentan reducir la selección de parásitos resistentes para que las drogas de las que disponemos sean lo más eficaces posibles durante muchos años.

Se han probado las siguientes combinaciones (97):

1. Dosis única de Anfotericina B liposomal (IV) 5 mg/kg + Miltefosina oral durante 7–14 días a una dosis para adultos > 50 kg de 150 mg/día.

2. Dosis única de Anfotericina B liposomal (IV) 5 mg/kg + Paramomicina i.m 15 mg (11 mg base)/ kg/ día durante 10 Días.
3. Miltefosina oral + paramomicina i.m 15 mg (11 mg base)/ kg/ día durante 10 días.
4. Estibogluconato de sodio o antimoniato de meglumina (im o iv) 20 mg Sb^{v+}/kg/día durante 17 días + paramomicina im 15 mg (11 mg base)/ kg/ día durante 17 días.

Los tres primeros regímenes, se han basado en estudios realizados principalmente en la India (98)(99)(100), mientras que la cuarta pauta, se basa en estudios realizados en el este de África (Sudán, Kenia, Uganda, Etiopía…)(86)(85).

Estos estudios se han realizado principalmente en pacientes no VIH. En pacientes que son VIH positivos, existe una menor respuesta a los tratamientos y mayor riesgo de recidivas. Este tema, se desarrollará más adelante, cuando se hable de las especificidades de la leishmaniasis visceral en estos pacientes.

8. La coinfección: Leishmania visceral en pacientes VIH.

El primer caso notificado de leishmaniasis asociado a VIH fue en el año 1985, y a éste le siguieron miles de casos de coinfección leishmania/VIH. Posteriormente, tras la introducción del HAART (siglas en inglés de Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad), los casos han disminuido sobre todo en Europa, constituyendo todavía un inmenso problema en el resto de los países.

Por la clara interconexión entre la patogenia de ambas enfermedades, el hecho de estar coinfectado, supone una peor evolución de las dos enfermedades, con dificultades para el diagnóstico y el tratamiento.

8.1 Epidemiologia y datos estadísticos de la coinfección LEISHMANIA/VIH en el mundo

El VIH sigue siendo una de las enfermedades con mayor impacto sobre las poblaciones y su desarrollo. Según los últimos datos de la OMS, en 2013 unos 35 millones de personas vivían con VIH.

De éstos, 12.9 millones tienen acceso a terapia antirretroviral, representando un escaso 37% de todas las personas diagnosticadas. En África subsahariana, existen 24,7 millones de personas que viven con VIH, y en esta región, se concentra casi el 70% de todas las nuevas infecciones en todo el mundo.

En Asia y el pacífico, existen 4.8 millones de persona con VIH, y en América Latina 1,6 millones. En Europa y Norte América, existen unos 2.3 millones de personas infectadas.

En estas regiones, los pacientes se encuentran expuestos a su vez a otras infecciones dado que, a nivel geográfico, se solapan con áreas donde existen vectores transmisores de otras enfermedades, como en este caso, la leishmaniasis.

La pandemia de VIH ha condicionado una profunda transformación de la historia natural de la leishmaniasis. La infección VIH incrementa el riesgo de padecer leishmaniasis visceral, multiplicando el riesgo entre 100 y 1000 veces en zonas endémicas (4)(101). Además, condiciona a su vez una peor respuesta al tratamiento y aumenta la posibilidad de recaída. La leishmaniasis visceral, facilita la progresión de la infección VIH y la evolución y desarrollo de situaciones y enfermedades definitorias de SIDA (102). Esto es debido a que las dos enfermedades tienen como objetivo las mismas células, y de manera sinérgica atacan al sistema inmune.

La coinfección Leishmania/ VIH ha sido declarada en 35 países y supone entre un 2%-12% de todos los casos de leishmaniasis visceral. Con este tipo de datos, es de suponer que la tasa de coinfección irá aumentando en los próximos años. Además existe una infraestimación

notoria en los datos, ya que la leishmaniasis no está dentro de la lista de enfermedades oportunistas del CDC y por lo tanto los casos que son notificados, son pocos (103).

La mayoría de la notificación de casos, proviene del sur de Europa. Hasta el año 2001, de los más de dos mil casos notificados, el 90% provenían de Francia, España, Italia y Portugal (104). Evidentemente, esto es explicado porque el resto de países que presentan el mayor número de pacientes coinfectados, carece de sistemas de notificación y en ocasiones la leishmaniasis ni siquiera puede llegar a ser diagnosticada, o se confunde con otras enfermedades endémicas de esas áreas, como por ejemplo, la malaria (105).

En Asia (sobre todo la India) existe a día de hoy el mayor foco de leishmaniasis visceral del mundo, y esto conlleva una gran cantidad de casos de pacientes coinfectados (106). Las cifras oficiales estiman un aumento progresivo de las tasas de coinfección que cifraban en el año 2000 en un 0.88% y que ha aumentado a un 2.18% en los últimos datos de 2006. Se cree no obstante que existe una baja notificación, y existe gran preocupación ya que están apareciendo casos en países vecinos como Nepal.

En América del Sur el principal país afectado es Brasil donde durante los últimos años vienen aumentando progresivamente las cifras de coinfección, gracias a un buen sistema notificador de ambas enfermedades, y actualmente presentan un 0.1% de los casos de coinfección (107)(108). Si bien hay que recordar que en Brasil las presentaciones clínicas más frecuentes son la cutánea y mucocutánea, cuya historia natural también se ha visto modificada por el VIH, con mayor número de presentaciones atípicas y peor evolución y respuesta al tratamiento.

En África los datos son muy variables. Los países principalmente afectados son Sudán, Etiopía, Kenia, Uganda y Burkina Faso (109). Existen áreas muy afectadas por altas

tasas de coinfección, como por ejemplo Humera en Etiopía, con un 15-30% de coinfectados (110). En estas áreas, es vital el refuerzo de estrategias que aumenten el acceso a terapia antiretroviral para mejorar la evolución de ambas enfermedades. En estos países que presentan tasa altas de infección por VIH, la existencia migraciones con grandes campos de refugiados, y amplios movimientos de población, hace que en cortos periodos de tiempo personas que normalmente viven áreas no afectas por leishmania, se asienten en zonas de alta endemia favoreciendo el aumento de casos de coinfección y la aparición de brotes epidémicos.

En el resto del mundo existen casos importados de leishmaniasis visceral, en muchas ocasiones con coinfección con VIH, como en Australia, Estados unidos, etc (71)(111).

8.2 Información epidemiológica en Europa:

En Europa, hasta el año 2001, se habían notificado 1911 casos de coinfección en el conjunto de los países denominados de la "cuenca mediterránea" que incluyen, España, Portugal, Italia y Francia.

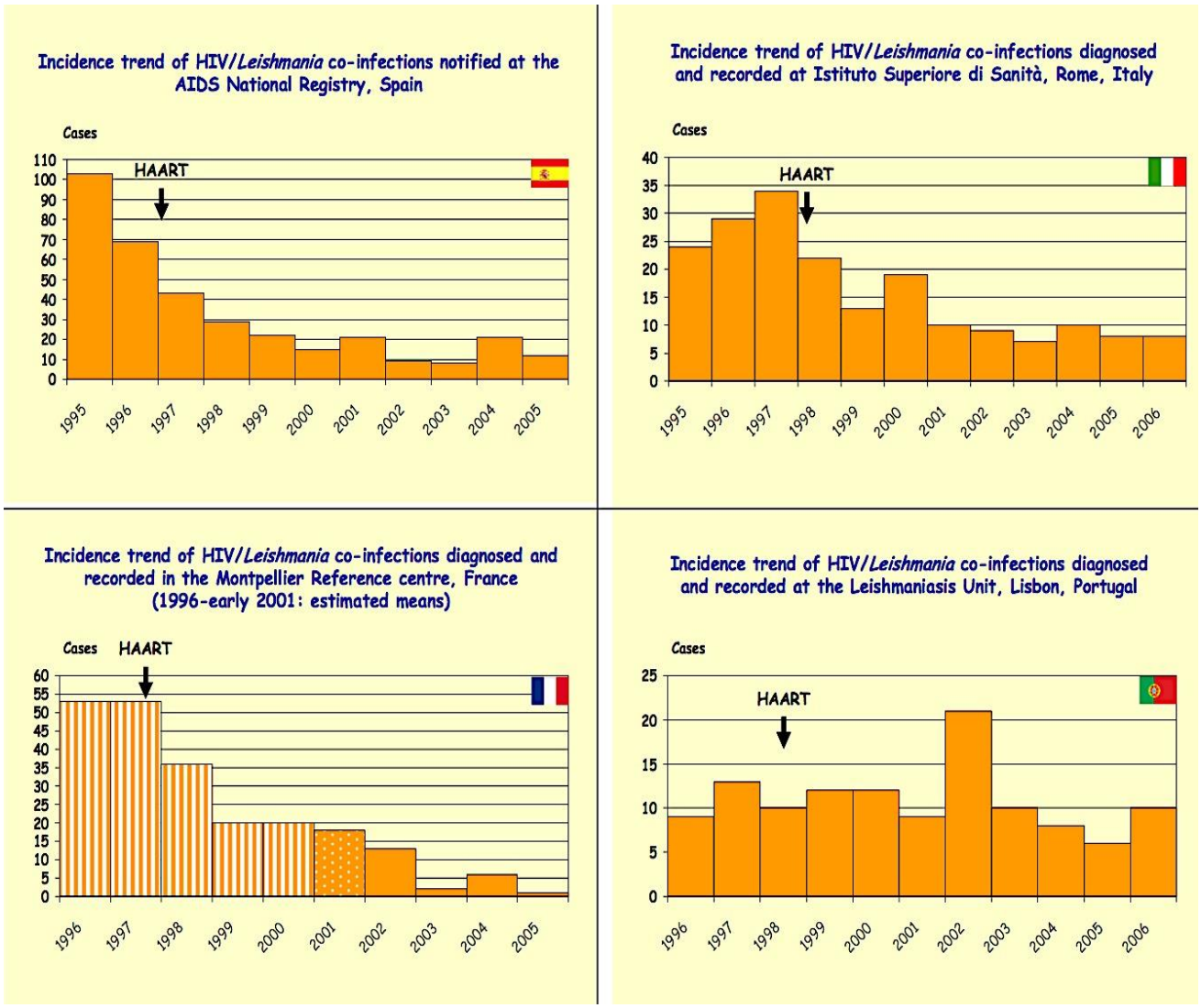
Se observan claramente dos periodos con incidencias muy diferentes, con un hito que marcó un cambio en estas incidencias, que fue la introducción de las terapias antirretrovirales, haciendo que se divida las historia de la coinfección clásicamente en dos periodos con características epidemiológicas muy diferentes.

Hasta el año 1998 se declararon la mayoría de los casos, con un pico de incidencia entre los años 1996 y 1998. En 1997 se introdujeron las terapias antirretrovirales observándose una disminución muy importante de nuevos casos de coinfección salvo, por razones desconocidas, en Portugal (103).

Desde 2001 a 2006, se han descrito unos 241 casos nuevos, con la siguiente distribución: 95 casos en España, 64 en Portugal, 52 en Italia y 30 en Francia (ver siguientes tablas), confirmándose, que es España donde se describen el mayor número de casos. Esto último probablemente sea debido a la coexistencia de un mayor número de nuevos pacientes VIH con respecto al resto de Europa, en un área endémica, lo que traduce un mayor riesgo de reactivación de infecciones asintomáticas y nuevos casos.

Merece mención aparte la descripción de primoinfecciones por Leishmania en pacientes ADVP (adictos a drogas vía parenteral), circunstancia que justificó un gran número de casos en el primer periodo entre los años 1990 y 1998. Desde 1998 al 2001, se ha ido observando un claro descenso en la incidencia de la coinfección leishmania-VIH probablemente asociado al menor consumo de drogas por vía parenteral, así como la introducción del tratamiento antirretroviral a una escala más amplia, manteniendo tasas estables hasta la fecha.

Figura 10. Extraídos de WHO: Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. Addis Ababa, Ethiopia, 20–22 March 2007.



Por lo tanto en los últimos 20 años se han identificado claramente dos patrones de paciente coinfectado de acuerdo a los factores de riesgo predisponentes, que coinciden con los descritos como vías de transmisión para el VIH.

Entre 1990 y 1998, el principal factor de riesgo fue el consumo de drogas por vía parenteral (hasta en un 76%) seguido en segundo lugar de las prácticas heterosexuales (12%),

y desde 1998 hasta 2006, sobre una muestra de 95 pacientes, un 67% eran ADVP y un 23% heterosexuales, manteniéndose estable la incidencia entre la población homosexual, cifrada entre un 10%.

Figura 11. Extraída de WHO: Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. Addis Ababa, Ethiopia, 20–22 March 2007.

Risk group	1990 –2000	2001–2006
IVDU	72%	64%
Heterosexual	13%	22%
Homosexual	10%	9%

Entre estos dos periodos, no hubo cambios en el sexo ni en la edad media de afectación, siendo siempre más predominante en hombres y con una edad media de aproximadamente unos 38 años. Merece la pena destacar que durante todo el periodo descrito desde 1990 hasta el 2000, los pacientes han presentado un nivel de CD4 < 200 en un 88-92% de los pacientes, mientras que en el segundo periodo, estos porcentajes cayeron, indicando una mejora en el nivel de inmunidad.

Figura 12. Extraída de WHO Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. Addis Ababa, Ethiopia, 20–22 March 2007.

CD4+/µl	1990 –2000	2001–2006
<200	789 (92.4%)	113 (88.3%)
200–500	59 (6.4%)	13 (10.1%)
>500	10 (1.2%)	2 (1.6%)

En el resto de Europa, existe notificación esporádica de casos en Grecia, Reino Unido(112), Alemania(113), etc…correspondiente en la mayoría de las veces, a casos importados(10) (13)(114)(115).

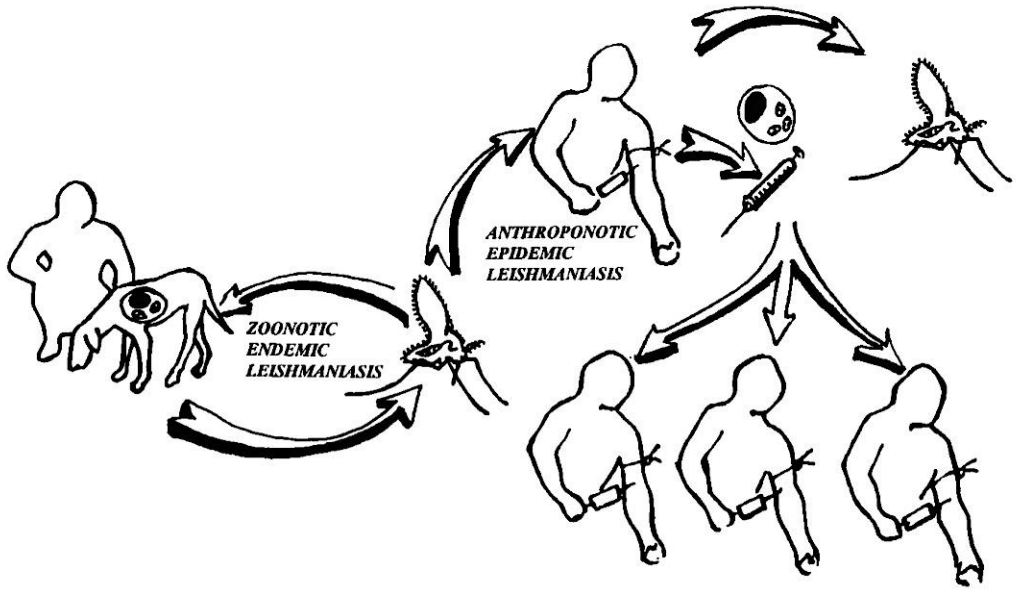
La presencia de una prevalencia muy alta de ADVP en España explica porque hemos mantenido un mayor número de casos que en el resto de Europa. En España, el consumo de droga por vía parenteral, era unas 5 a 7 veces superior que la media del resto de Europa, lo que durante 1993 provocó que la incidencia de VIH fuera hasta 3 veces mayor en España, y el doble que en Italia y Francia.

Dado este aumento de casos, y la identificación de ADVP como claro factor de riesgo, tras varios estudios, se describió un nuevo ciclo para la leishmania que se denominaba artificial, epidémico y antroponótico.

En este ciclo, las jeringuillas substituían a los flebotomos, y los amastigotes se trasmitían directamente por lo que no existían determinados puntos del ciclo habitual del parásito, y los drogadictos actuaban como reservorios. Todo esto en un contexto epidémico. Este ciclo se resume en la figura 13 a continuación.

La disminución de la utilización de la vía parenteral para el consumo de drogas, y la introducción de HAART de manera amplía ha condicionado que los casos hayan disminuido mucho en las últimas décadas.

Figura 13. Zoonotic and anthroponotic L. infantum cycles (extraído del artículo de Alvar et al: Leishmania and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years).



La leishmaniasis visceral en los pacientes VIH presenta características específicas que se mencionaran más adelante. Unos de los aspectos importantes de estos pacientes es saber si estamos ante una primoinfección o una reactivación.

Un paciente VIH puede presentar varios episodios de leishmaniasis visceral durante su vida, y una gran parte de estos episodios, se tratan de recidivas.

Por ejemplo, en Portugal y España, entre los años 2001-2006, se comunicaron 95 casos de primoinfección, y 34 casos de recaídas. Esto se evidenció mediante estudios moleculares que demostraban que se trataba de la misma "cepa" de leishmania realizando estudios de zimodemas. Para analizar el tipo de leishmania que está implicada en cada caso, se utiliza el análisis de las isoenzimas, realizándose análisis de los distintos tipos de zimodemas (conjuntos de isoenzimas analizadas mediante electroforesis).

El análisis de los diferentes tipos de zimodemas, ha supuesto un gran avance para la taxonomía y epidemiologia de la infección por Leishmania, observándose que en los casos de recidivas se encuentra el mismo tipo de zimodema, sugiriendo que se trata de una recidiva más que de una reinfección(102)(116).

Se ha constatado, que en pacientes inmunocompetentes, las zimodemas aisladas de L. *infantum* de manera más frecuente son: MON-27, MON-28, MON-72, MON-77 y MON-187 y que éstas, producen sólo leishmaniasis visceral, mientras que las MON-11, MON-24, MON-29, MON-33, MON-78 y MON-111 sólo producen leishmaniasis cutánea, existiendo otros conjuntos aislados que pueden producir ambos tipos.

En los pacientes VIH negativos, la zimodema encontrada de manera más frecuente en leishmaniasis visceral es la MON-1(117) (en un 80% de los casos de leishmaniasis visceral por L. *infantum*) , que se encuentra más raramente en pacientes VIH positivos (sólo la mitad de estos pacientes).

En estos últimos, se encuentran zimodemas que se encuentran de manera excepcional en pacientes inmunocompetentes, y a su vez, la misma zimodema, muestra diferentes tropismos según el status del VIH en cada paciente. Las zimodemas MON-24, MON-28, MON-29, MON-33, MON-34, MON-77 y MON-78 se aíslan de manera más frecuente en pacientes que son VIH positivos y casi no se encuentran en pacientes inmunocompetentes. Así, se constata que en pacientes coinfectados hay una mayor heterogenicidad de zimodemas (103)(118)(119).

Como curiosidad cabe destacar que en pacientes VIH con leishmaniasis visceral se encuentran en ocasiones zimodemas generalmente asociadas con la producción de leishmaniasis cutánea, lo cual puede sugerir que debido a la mala inmunidad desarrollada,

estos tipos de leishmania que en paciente inmunocompetentes producen leishmaniasis cutánea, en situaciones de deficiente inmunidad pueden visceralizarse (103)(120).

8.3 Patogénesis de la coinfección

Desde hace años, se sabe que la infección por el parásito Leishmania actúa como potenciador de la replicación viral de VIH y favorece una más rápida evolución a estados definitorios de SIDA. Ambas enfermedades tienen como objetivo la afectación de las mismas células, afectando la inmunidad celular y produciendo la infección de macrófagos y monocitos que actúan como reservorio del virus del VIH. Existen varios estudios que ponen de manifiesto como existen rutas moleculares compartidas, y como la infección por Leishmania activa ciertas vías que favorecen su replicación.

A nivel celular, se ha demostrado que el lipofosfoglicano (LPG) en la superficie celular de L. *donovani* además de otras estructuras, actúa favoreciendo la replicación viral. Este LPG se encuentra en la superficie del promastigotes que una vez inoculado es fagocitado por los macrófagos donde dentro de los fagolisosomas, cambia al estado de amastigote. Durante la fagocitosis, los promastigotes pierden la mayoría de los LPG de su membrana exterior quedando solo el componente interno, denominado core-PI que solo se encuentra en la superficie de los amastigotes. Los LPG están ligados al disfuncionamiento de determinadas actividades de los macrófagos, consiguiendo por ejemplo, que no se pueda sintetizar radicales de oxígeno, que como ya hemos mencionado previamente, son vitales para la destrucción de agentes infecciosos por parte del macrófago. Los LPG se ha demostrado que son activadores de la replicación del virus en células monocíticas infectadas que están en estado latente, y que son potentes inductores de la transcripción a través de estimulación del LTR (repetición terminal larga) del VIH-1. El core-PI, mencionado más arriba, que se encuentra en membrana

de los amastigotes, es también un potente activador de la actividad de LTR dependiente para estimular la transcripción (121). Esto último es de vital importancia, ya que es en este estadio cuando se produce la infección de Leishmania en el ser humano.

Como consecuencia de los diversos estudios realizados, se puede afirmar que en un individuo infectado por el VIH, pero que se encuentra clínicamente asintomático con bajos niveles de replicación viral, la infección por Leishmania actúa como desencadenante para un aumento importante de la replicación viral favoreciendo la evolución a SIDA. Además, en ambas enfermedades es de vital importancia el hecho de que la respuesta celular se mediada por la vía Th1 o la víaTh2 (57). La leishmaniasis, como ya se mencionó previamente, suele evolucionar a una afectación visceral cuando no se produce una respuesta Th1 adecuada.

En los pacientes VIH parece haber una tendencia clara a desarrollar respuestas Th2 en pacientes que se infectan con Leishmania. En diversos estudios in vitro, se ha evidenciado que la infección por Leishmania produce una regulación al alza de receptores CCR5 y CRXY y GP 120 en la superficie del linfocito CD_4^+, produciendo una facilitación de la entrada del virus en la célula (121).

Todos estos mecanismos suponen la confirmación de que la infección de Leishmania en un paciente VIH produce un aumento de replicación viral y una mayor rapidez de evolución a SIDA(como ya hemos mencionado previamente), pero lo que también se observa, es que la infección por VIH produce un aumento del crecimiento de los parásitos en el interior de los macrófagos en comparación con la infección aislada por Leishmania.

De esta manera, existe una falta de control de la multiplicación de los parásitos, debida

a la modificaciones que ocurren en los macrófagos tras la infección VIH, que impide una correcta fagocitosis, y una disfunción de las citoquinas y vías de señalización que intervienen en el control de la parasitación.

8.4 Técnicas diagnósticas en la coinfección:

En los pacientes VIH existen diversos problemas que hacen que el diagnóstico de leishmaniasis sea más complicado que en individuos inmunocompetentes. En los pacientes VIH, la presentación clínica del cuadro es mucho más atípica, y supone en muchas ocasiones un reto diagnóstico para los clínicos. Si a eso sumamos las dificultades de determinados métodos diagnósticos en determinados entornos, así como la presencia de enfermedades muy prevalentes con síntomas parecidos (como la malaria) no es de extrañar que en ocasiones sea muy complicado llegar al diagnóstico.

A nivel de las diferentes técnicas, son las técnicas serológicas las que suponen un mayor problema, ya que aunque no son invasivas, y son muy simples de realizar, en pacientes inmunodeprimidos se ha descrito que es más difícil que se generen anticuerpos en un nivel adecuado para su detección. Aunque existen estas dificultades ya mencionadas, estas pruebas adquieren una importancia enorme en pacientes VIH, ya que estos presentan frecuentes recidivas, con las consiguientes pruebas diagnósticas que han de realizarse, por lo que frecuentemente los pacientes no desean realizarse más pruebas invasivas y son estas técnicas, que se realizan en muestras de sangre periférica, las que se intentan realizar de manera prioritaria.

La detección de parásitos por microscopía o a través de métodos de cultivo sigue siendo el “gold estándar” en la coinfección. El aspirado de médula ósea y posterior visión de los parásitos por microscopia, sigue siendo el método más utilizado en el diagnóstico de los

pacientes coinfectados con sensibilidades que oscilan entre 67-94% (similares a los pacientes inmunocompetentes) (122).

La observación de amastigotes en sangre periférica presenta unas sensibilidades entre 50-53% de estos pacientes, con la ventaja de que se trata de una técnica muy poco invasiva y relativamente fácil de realizar. Todas las técnicas basadas en la visualización de parásitos, precisan de una persona bien formada y con experiencia, y puede ser difícil la visualización y producirse falsos negativos, ya que debido a la pancitopenia, puede ser difícil encontrar células infectadas.

De los tejidos utilizados para cultivo, el aspirado medular suele ser el más empleado por su relativa facilidad de ser obtenido y con menor tasa de complicaciones si lo comparamos, por ejemplo, con el aspirado esplénico. Presenta una sensibilidad en paciente coinfectados de entre 50-100%.

Las técnicas serológicas, como ya hemos mencionado, tiene unas sensibilidades muy limitadas, presentando solo el 40% de los pacientes niveles adecuados de anticuerpos (123). Debido a estas bajas sensibilidades, está indicada la realización de dos pruebas serológicas para aumentar la sensibilidad.

Para la técnica por inmunofluorescencia indirecta (IFAT), están descritas sensibilidades de entre un 11-67%. La realización de la técnica de ELISA con antígeno crudo de Leishmania presenta sensibilidades mejores, de entre un 76-89%, pero realizado con antígeno rK39 las sensibilidades caen a un 22-64%. Estas bajas sensibilidades han condicionado que una técnica que es muy útil en pacientes inmunocompetentes, que es fácil de realizar y no es muy cara, no sea conveniente en el caso de pacientes infectados por el VIH (124). Hay que tener en cuenta, que muchas de estos datos son extraídos de estudios

realizados en la era pre-TARGA, o en años donde todavía no había un acceso tan global al tratamiento, por lo cual es posible que estos datos hayan mejorado.

Cabe una mención especial al test de aglutinación directa (DAT) que como mencionamos previamente en el apartado de técnicas diagnósticas de leishmaniasis sin distinción de si los paciente son coinfectados o no, había presentado muy buenos resultados en algunos estudios (125). En estos estudios, principalmente realizados en Sudán, en los pacientes coinfectados, se mencionan sensibilidades de entre un 89-95%, si bien es cierto que la realización de esta técnica precisa de material técnico que no está al alcance de muchos laboratorios en países endémicos de leishmaniasis.

Varios estudios han señalado que la combinación de DAT y la realización del test rápido de rK39, es la combinación perfecta en lugares endémicos (66)(123)(126)(127).

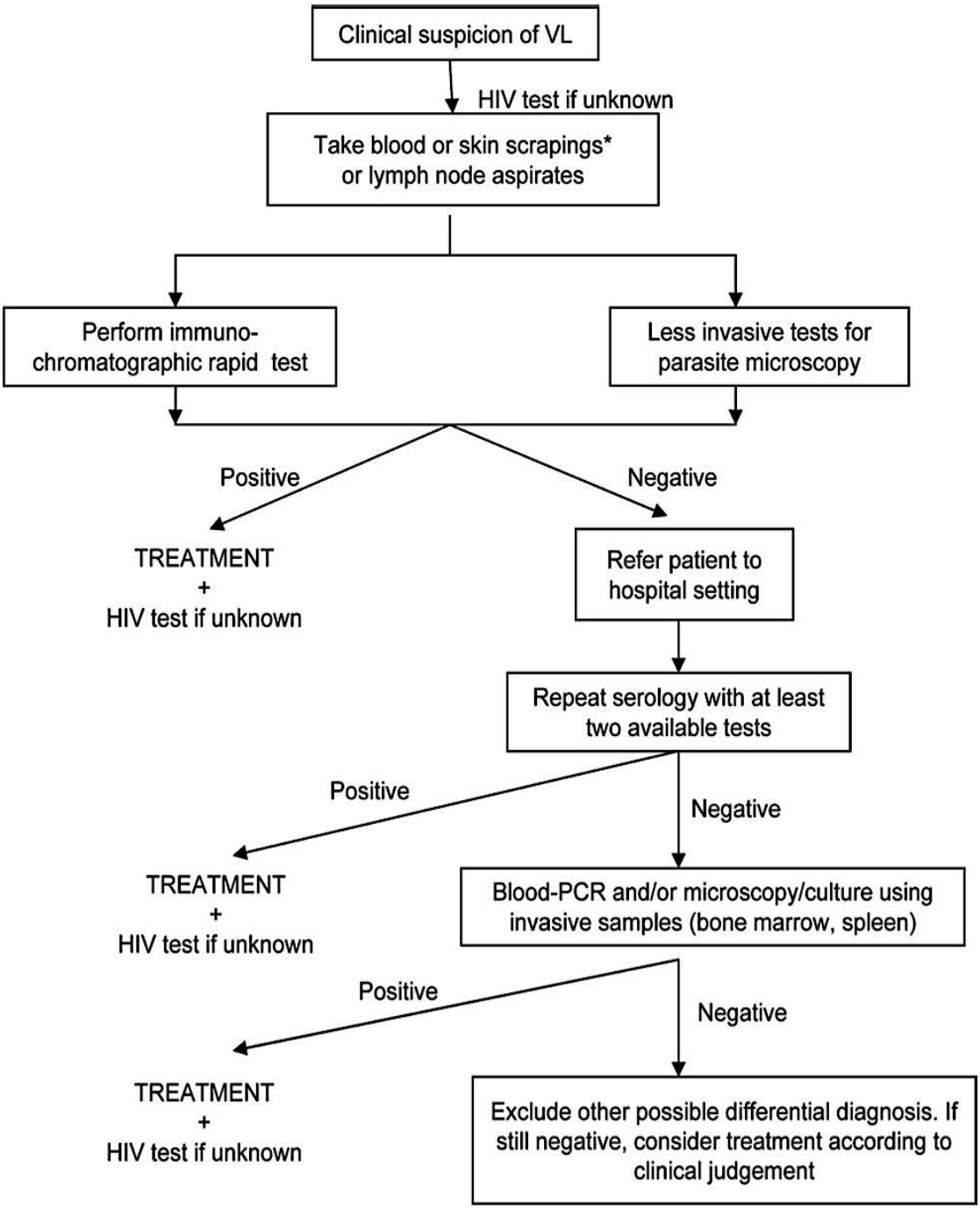
La PCR presenta como ventaja la posibilidad de realizarse sobre diferentes tejidos, realizándose sobre todo en aspirados de médula ósea y sangre periférica donde están descritas unas sensibilidad entorno a un 72-100% (128)(129).

La PCR cuantitativa, de aparición reciente, es muy prometedora, ya que a parte del diagnóstico existe cierta capacidad de predecir recidivas ante su aumento progresivo tras un correcto tratamiento. La posibilidad de poder realizar esta técnica en sangre periférica, permite no realizar pruebas invasivas en pacientes, sobre todo ante sospechas de una recidiva, aunque los resultados de esta técnica para predecir recaídas presenta resultados variable, y se necesitan más estudios.

Por lo tanto, como resumen de estrategia diagnóstica, la WHO en el año 2007 tras una cumbre en Addis Abeba, Etiopía, propuso el algoritmo que está a continuación, para el

diagnóstico de leishmania en pacientes VIH que sigue siendo el algoritmo utilizado actualmente:

Figura 14. Algoritmo diagnóstico propuesto por WHO.



8.5 Clínica de leishmaniasis visceral en pacientes con infección VIH

Parece que en pacientes VIH, la leishmaniasis visceral se manifiesta clínicamente de manera diferente con respecto a la población seronegativa, describiéndose clásicamente tasas de curación más bajas y mayor porcentaje de recaídas(130)(131).

Se pueden encontrar ausentes síntomas que suelen estar siempre presentes en pacientes inmunocompetentes, como por ejemplo la esplenomegalia, e incluso puede haber casos de leishmaniasis oligosintomática. Los periodos de incubación se estiman que son menores, sobretodo en pacientes con una gran inmunodepresión, pero no están claramente descritos. Las manifestaciones clínicas son mucho más variadas, y con zimodemas asociadas exclusivamente a producir casos de leishmaniasis cutáneas que pueden producir leishmaniasis visceral y expresiones atípicas como casos de leishmaniasis visceral que pueden acompañarse de lesiones cutáneas severas e incluso manifestaciones mucocutáneas (132).

La triada clásica de síntomas (fiebre, pancitopenia y hepato/esplenomegalia) suele estar presente en aproximadamente un 75% de los pacientes. Se encuentran también presencia de estos parásitos en lugares más inusuales, afectando pulmones, faringe, e incluso produciendo uveítis. Es importante resaltar la afectación gastrointestinal, que puede llegar a afectar hasta al 50% de los pacientes (133). Se pueden aislar amastigotes a cualquier nivel, y en ocasiones se pueden encontrar en muestras extraídas de endoscopias realizadas para estudio de síntomas digestivos.

La mayoría de las primoinfecciones acontece en pacientes que presentan menos de 200 $CD4^+$, aunque hay casos descritos con más de 500 cels/µl. La clínica de las recaídas, suele ser similar a la presentada en las primoinfecciones. Desde la introducción del TARGA, la clínica no ha cambiado, y tampoco han disminuido el número de recidivas (103).

Normalmente en pacientes recibiendo TARGA, se encuentran niveles más bajos de plaquetas y mayor leucopenia, así como niveles de transaminasas más elevadas. A nivel analítico, no se encuentran grandes diferencias, presentándose la pancitopenia, según diversos estudios entre un 35-77% de los pacientes. En nuestro caso, en los pacientes estudiados, nos llamó la atención el nivel muy elevado de ferritina en las analíticas, frecuentemente por encima de > 1000 mg/dl, ya descrito en la literatura que aparecía de manera prácticamente constante, y que se detallará más adelante en el apartado de resultados y discusión.

8.6 Tratamiento de leishmaniasis visceral en pacientes coinfectados:

En la coinfección Leishmania/VIH, existen ciertas particularidades con respecto al tratamiento. Las opciones de tratamiento y la tasa de éxito son menores, siendo más frecuentes los efectos secundarios. Existen diversas opciones de tratamiento cuyos ensayos clínicos no incluían pacientes coinfectados, y de hecho, son pocos los estudios realizados ex profeso en este tipo de pacientes (103). El hecho de que existan tantas recaídas favorece la aparición de resistencias a determinados tratamientos y hace que el número de posibilidades terapéuticas, ya pequeño, quede limitado. Otro de los problemas existentes deriva del hecho de que se extrapolan lo resultados obtenidos en ensayos clínicos realizados en leishmaniasis visceral por L. *donovani* a los casos europeos, que están producidos por L. *infantum.* Estudios en inmunocompetentes han demostrado que la respuesta al tratamiento de ambas especies es diferente (6).

Por lo tanto, en los pacientes coinfectados, nunca se presupone un cura total, y se esperan múltiples recaídas, por ello está indicado en determinados presupuestos la instauración de un tratamiento profiláctico, aunque existe insuficiente evidencia sobre las pautas óptimas de profilaxis (103).

No existe a día de hoy ningún consenso ni guías que establezcan con evidencia

suficiente cual es el tratamiento indicado en este tipo de pacientes (123). Todos las recomendaciones tiene muy bajo nivel de evidencia. En Europa, los pocos estudios realizados han sido con anfotericina B en sus diferentes presentaciones (anfotericina B deoxycolato, anfotericina B complejo lipídico, anfotericina B liposomal) lo que permite que se establezca como primera opción terapéutica dado que los estudios son de los pocos realizados en paciente coinfectados con L. *infantum* (134).

De todas las presentaciones, como primera opción destaca la anfotericina B liposomal por su menor tasa de efectos secundarios, aunque hay que resaltar, que en otras regiones con casos de coinfección, es una medicación a la que no se tiene acceso.

Los antimoniales, que son la primera línea de tratamiento en inmunocompetentes en muchos países, no son un tratamiento de primera elección y deberían reservarse como tratamiento de segunda línea en estos pacientes, ya que muestran una mayor toxicidad y menores tasas de curación.

En un estudio realizado en población española, se constataron una alta tasa de efectos adversos y como efecto secundario a destacar, hay que mencionar la aparición de pancreatitis ligada al tratamiento, que supuso la muerte de 3 pacientes (135). Posteriormente se han realizado otros estudios comparativos que confirman estos datos, y muestran menor tasa de efectos secundarios con anfotericina B liposomal (136).

Con el resto de tratamientos utilizados en pacientes inmunocompetentes, no existen estudios bien diseñados para estudiar la eficacia, y perfil de seguridad en pacientes coinfectados, y solo existen series de casos publicados.

La miltefosina ha demostrado ser una droga útil para el tratamiento combinado, pero como tratamiento único en pacientes coinfectados muestra unas tasas de recaídas muy altas al

poco tiempo del cumplimiento del tratamiento (137)(138). Los efectos secundarios son ligeramente más frecuentes en pacientes VIH y se tratan principalmente de vómitos y trastornos gastrointestinales (139).

La utilización de paramomicina es una terapia recientemente aprobada para el tratamiento de leishmaniasis visceral, y no existen estudios realizados en pacientes coinfectados. Se han objetivado tasa de recaídas altas después del tratamiento, y la capacidad de la leishmania para generar resistencias también se ha descrito (140)(141)(69).

Dada la dificultad del tratamiento en este tipo de pacientes, la utilización de terapias combinadas ha sido propuesta como una opción esperanzadora, ya que permitiría la disminución de dosis favoreciendo menores efectos secundarios y aumentaría la posibilidad de éxito y la inducción de menor tasa de resistencias. Sin embargo, en el momento actual, no existen ensayos clínicos realizados, y sólo existen publicados pequeñas experiencias aisladas a respecto que desarrollaremos más adelante en la sección de resultados (142)(99).

8.7 Terapia antiretroviral de alta actividad (TARGA/ HAART) y profilaxis secundaria:

La terapia antirretroviral fue introducida en Europa en 1996. Su introducción, como ya hemos mencionado, redujo la incidencia de nuevos casos de leishmaniasis visceral, influyendo en el aumento de la cifra de CD_4^+, que parece clave a la hora de no desarrollar leishmaniasis visceral. Así mismo se ha objetivado que el tratamiento antirretroviral reduce la morbilidad y la mortalidad de estos pacientes (103).

Se ha intentado estudiar si existen determinados antirretrovirales que pudieran presentar cierta actividad antiparasitaria, pero de momento no se ha encontrado evidencia suficiente para justificar que los pacientes coinfectados precisen un cambio en su tratamiento antirretroviral (143)(144).

Existen estudios que apuntan a cierta actividad antiparasitaria contra Leishmania de los inhibidores de proteinasa indinavir, saquinavir y ritonavir, pero son estudios in vitro que muestran actividad a concentraciones altas de estos fármacos, que no son fáciles de alcanzar in vivo (145)(146). También se ha planteado la posibilidad de un efecto antiparasitario de los inhibidores del CCR5, molécula que juega un papel en la entrada en la célula CD4 tanto para VIH como para Leishmania, aunque estos resultados tampoco se han demostrado in vivo(147). Actualmente no hay ninguna recomendación sobre una pauta específica de antirretrovirales que sea preferible a otra en los pacientes coinfectados.

Dada la alta tasa de recaídas en pacientes VIH tras el correcto tratamiento de un primer episodio de leishmaniasis visceral, se ha acabado por concluir que en un paciente VIH nunca debemos considerar un episodio de leishmaniasis visceral como curado.

La introducción de la terapia TARGA supuso un descenso en el número de nuevos casos, pero sabemos que no reduce las recaídas (103). El mantener un contaje de CD_4^+ en un nivel superior a 200 cel/µl, con carga viral indetectable, ayuda a disminuir las recaídas, pero no por completo. Entre un 25 y un 70% de los paciente que reciben TARGA presentan recaídas, pero lo que se sí parece conseguir el TARGA es retrasar estas recaídas con un mayor tiempo entre cada episodio (una media de 7 meses).

Por otro lado, la introducción de antirretrovirales puede conducir a un síndrome de reconstitución inmune asociado a Leishmania, aunque es infrecuente (148)(149).

Por estos motivos la profilaxis primaria no está indicada, pero mantener una profilaxis secundaria tras un primer episodio está recomendado. Esta recomendación se basa en estudios realizados principalmente en Europa, que no son aleatorizados ni controlados. La profilaxis en Europa se realiza principalmente con anfotericina B liposomal 3-5 mg/kg/día cada 3-4

semanas o antimoniales 20 mg/kg/ día cada 3-4 semanas. En otras zonas del mundo se ha realizado profilaxis con pentamidina, pero es muy mal tolerada.

Se han intentado utilizar otras drogas, de las que hay experiencia limitada a casos de pacientes que han recibido tratamiento prolongado con metronidazol, o se han intentado utilizar de manera combinada los esquemas tradicionales más alopurinol o miltefosina, sin clara evidencia que justifique su uso de manera asidua. Finalmente, hay casos aislados de profilaxis exitosa con derivados de azoles (itraconazol, fluconazol) aunque habitualmente asociados a otros tratamientos(150).

8.8 Papel de la respuesta celular a estimulación con Antígeno Soluble de Leishmania (SLA) en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con coinfección leishmania/VIH.

Entre los objetivos de esta tesis está determinar el papel prometedor del análisis de la respuesta celular linfoproliferativa tras estimulación con antígeno soluble de leishmania (SLA) para el manejo de los pacientes coinfectados.

En la actualidad, uno de los grandes desafíos en los pacientes coinfectados es saber cuándo se debe instaurar un profilaxis secundaria, y si se inicia, cuándo retirarla.

La condición de inmunosupresión de los pacientes VIH es un factor reconocido para desarrollar leishmaniasis visceral, y también es un factor de riesgo para presentar una peor respuesta al tratamiento y mayor riesgo de recaídas. Como ya hemos mencionado, existe evidencia de que una pauta de profilaxis secundaria disminuye el riesgo de recaídas de leishmaniasis en los pacientes VIH que han terminado un ciclo de tratamiento, aunque se desconoce la pauta óptima para realizar esta profilaxis (95)(122). Debido a esto, habitualmente se recomienda mantener la profilaxis secundaria después de un primer episodio de leishmaniasis visceral en determinados contextos (bajo contaje de $CD_4^{+,}$ presencia de PCR

positiva, carga viral detectable, etc) (6)(131)(225)(226), sin que se pueda hacer una recomendación clara de cuando retirarla.

La profilaxis secundaria no es necesaria en todos los pacientes, ya que no todos los pacientes que no reciben profilaxis secundaria recaen, y además presenta una alta toxicidad y un alto precio, por lo tanto hay que intentar encontrar unos buenos predictores de recaída que permitan perfilar mejor qué pacientes se benefician de este tipo de profilaxis.

Hasta ahora, se han descrito varios factores predictores de fallo del tratamiento como la imposibilidad del paciente de aumentar su nivel de CD_4^+ y existencia de antecedentes de recaídas previas. En individuos con niveles de CD_4^+ altos, por encima de 250-300 cél/mL, parece claro según diversos estudios, que el riesgo de recaída es bajo, y por tanto no sería preciso iniciar una profilaxis tras un primer episodio de leishmaniasis visceral(151). Aunque esto es cierto para la mayoría de pacientes, existen pacientes con niveles superiores a 200 cél/mL que han presentado recaídas(152).

Por lo tanto, el contaje de $CD4^+$, es útil, pero no es suficiente para realizar una buena aproximación sobre las indicaciones de profilaxis. Todos estos aspectos son valorados a la hora de mantener una profilaxis secundaria, pero como ya hemos mencionado, existen recaídas en paciente con más de 200 cel/ µl $CD4^+$ lo que sugiere que existen otros factores implicados aún no descubiertos.

En este sentido, se han intentado encontrar herramientas que mejoren estas predicciones sin gran éxito. En pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral, el desarrollo de una adecuada respuesta inmunitaria, depende de la activación del IFN-gamma que produce un respuesta Th1 con activación de T-CD4 con respuesta específica para leishmania, que acaba desarrollando un respuesta que finaliza en la resolución de la

enfermedad con una cura completa sin recaídas posteriores (153).

La respuesta celular linfoproliferativa tras estimulación con antígeno soluble de leishmania (SLA) se ha propuesto como un buen marcador inmunológico del desarrollo de una respuesta específica Th1 con activación de T-CD4 específicos para leishmania tras la infección, de manera que pudiera ser utilizado como predictor de cura y de desarrollo de una respuesta adecuada sin posteriores recaídas.

Esta prueba se realiza tras la extracción de sangre periférica heparinizada, aislándose de esta muestra un conjunto de células mononucleares que se cultivan en presencia de 10 microgramo/ml de antígeno soluble de L. infantum (SLA) durante 5 días. Posteriormente se mide la proliferación celular mostrándose los resultados en un índice de estimulación (SI) para el antígeno. Esto nos da un punto de corte que define la presencia de una buena respuesta celular que estaría en aquellos resultados por encima de +3 SD (Desviación estándar) que corresponde a un valor de SI= 1.88. La descripción de este test está desarrollada ampliamente en material y métodos.

La hipótesis de nuestro trabajo es que en los pacientes con menos de 200 cel/µl CD_4^+ que presentaran una buena respuesta celular específica se podría suspender la profilaxis de manera segura (o no iniciarla) y se podrían considerar pacientes curados (se desarrolla más adelante en la discusión).

9. Pacientes infectados por Leishmania asintomáticos

Los pacientes infectados por leishmania, pero que se encuentran asintomáticos, suponen un desafío para los clínicos y es de vital importancia tenerlos en cuenta de cara al desarrollo de programas de control de la enfermedad.

Existe muy poca investigación en esta dirección, ya que evidentemente los recursos hasta ahora han estado focalizados en el estudio de los pacientes enfermos. No obstante, parece cada vez más evidente la necesidad de desarrollar estudios que nos permitan comprender mejor el rol que presentan este tipo de pacientes, y que factores están involucrados en el paso de un paciente asintomático al desarrollo de la enfermedad.

Existen diferentes estudios que han estudiado el ratio de pacientes asintomáticos por cada paciente enfermo, demostrándose así que la tasa de pacientes asintomáticos puede llegar a ser bastante alta y en estudios de diferentes países puede llegar a oscilar de 2.4: 1 en estudios en el este de Sudán(154) a ratios más altos, como por ejemplo, de 50:1 en España(155). Estos datos ponen de manifiesto que es probable que exista un alto número de pacientes que han estado expuestos, pero no han desarrollado la enfermedad, y hacen surgir preguntas en relación al papel de estos pacientes en la perpetuación de los ciclos y su actuación como reservorios. Hasta la fecha no se ha demostrado la capacidad infectiva de estos pacientes, pero se sospecha que puede que actúen como reservorios silenciosos.

La definición de “paciente asintomático”, no está claramente definida, pero se asume que esta condición se cumple, cuando un paciente sin clínica aparente, presenta una PCR positiva, un test de leishmanina cutánea positiva, o un test serológico positivo. Pero estos tests, han demostrado no ser del todo fiables, y se comienza a pensar que los métodos

moleculares son más fiables que los métodos serológicos. En los último años se están intentando desarrollar algunas técnicas de whole-blood IGRAs (Quantiferon), como alternativa a la leishmanina para el estudio de expuestos en áreas endémicas que están mostrando resultados prometedores, aunque es muy pronto para establecer el impacto final que tendrán(156).

En nuestra tesis, uno de los objetivos ha sido establecer unos criterios para definir un paciente asintomático, e intentar en base al test de SLA diferenciar entre pacientes con bajo riesgo de enfermar o por el contrario, con alto riesgo para el desarrollo de enfermedad (será desarrollado más adelante).

Una de las claves del estudio de los pacientes asintomáticos se centra en el descubrimiento de los factores que hacen que una persona desarrolle la enfermedad, y otra consiga establecer una buena respuesta inmunológica impidiendo que enferme. Dentro de estos factores se han encontrado diversos, como la malnutrición, diferencias genéticas entre los diferentes grupos de HLA, etc.

Por último, uno de los grandes retos es el manejo de estos pacientes, dado que de momento no hay ninguna prueba que cuantifique el riesgo de progresión a enfermedad. Este punto es de vital relevancia, sobretodo en aquellos pacientes que presentan otras comorbilidades, o enfermedades que alteran la inmunidad, como es el caso de los pacientes VIH, del tratamiento con inmunosupresores, etc, dado que es en estos pacientes donde existe un mayor miedo ante el desarrollo de enfermedad, por sus consecuencias.

II. OBJETIVOS

1.Objetivos

La elaboración de esta tesis comenzó a raíz del brote de leishmaniasis declarado en 2009 en Fuenlabrada, siendo la mayoría de los pacientes del hospital en el que trabajo, el Hospital Universitario de Fuenlabrada. Es el mayor brote de esta enfermedad producido hasta el momento en Europa, y supone una especial situación de peligro para los pacientes VIH residentes en la zona.

En este contexto único hasta ahora hemos pretendido realizar un estudio de la cohorte de pacientes VIH residentes en la ciudad. El seguimiento de este grupo de pacientes, nos ha permitido plantear varias investigaciones con diferentes objetivos:

1. Estimar la prevalencia de exposición a Leishmania infantum en pacientes VIH asintomáticos en zona de alta endemia y estimar el riesgo de pacientes VIH expuestos y asintomáticos de evolucionar a leishmaniasis visceral.
2. Realizar una estimación de la incidencia acumulada y la tasa de incidencia de leishmaniasis visceral en la cohorte de pacientes VIH que viven en la zona de brote.
3. Describir el cuadro clínico y evolución de los pacientes que han desarrollado la enfermedad durante el estudio.
4. Comparativa del cuadro clínico, pruebas diagnósticas e inmunológicas, tratamiento y evolución entre paciente inmunocompetentes, VIH y en tratamiento inmunosupresor.
5. Determinar los factores de riesgo para la exposición y para el desarrollo de leishmaniasis visceral en subpoblaciones (coinfección con VHC, raza negra...).
6. Validar la utilidad del test de linfoproliferación a SLA como marcador de curación que permita la retirada de profilaxis secundaria en pacientes con test positivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar la prevalencia de exposición a Leishmania infantum

En la literatura casi son inexistentes los artículos publicados sobre prevalencia de L. *infantum*, y son todavía menos frecuentes aquellos que analizan estos datos en situaciones de brotes.

La prevalencia se define como la proporción de individuos de un grupo o una población que presentan un evento determinado en un momento o periodo determinado de tiempo (prevalencia de periodo). No es de extrañar, por lo tanto, que no exista literatura a este respecto, ya que resulta complicado poder recabar los datos necesarios para este tipo de estudio.

En nuestro caso, la cohorte de pacientes VIH en nuestro hospital, permite un acceso frecuente para hablar con los pacientes, realizar pruebas y por tanto realizar un seguimiento estrecho. Estos pacientes acuden cada 3 meses a realizarse revisiones con una extracción previa de una analítica con niveles de CD_4^+, carga viral, anamnesis y exploración física básica. De esta manera uno de nuestro objetivos, ha sido intentar estimar la prevalencia de exposición a Leishmania en la cohorte de pacientes VIH de Fuenlabrada en el periodo comprendido entre 2009 y 2016. Además, una vez identificado el grupo de pacientes VIH expuestos a Leishmania y asintomáticos, el seguimiento de la cohorte nos permite conocer su evolución clínica para ver si alguno desarrolla leishmaniasis visceral. En el apartado de Material y Métodos, Definiciones, se detallan los criterios que proponemos para el paciente asintomático expuesto con alto y bajo riesgo de desarrollar leishmaniasis visceral.

2. ***Realizar una estimación de la incidencia acumulada y tasa de incidencia de leishmaniasis visceral en la cohorte de pacientes VIH que viven en la zona de brote.***

La tasa de incidencia se define como la proporción de individuos sanos que desarrollan la enfermedad a lo largo de un periodo determinado. Uno de nuestros objetivos específicos, ha sido determinar la incidencia en pacientes VIH que viven en una zona de brote.

La definición de brote (instituto de Salud Carlos III de Madrid) se define como el incremento significativamente elevado de casos en relación a los valores esperados.

La simple agregación de casos de una enfermedad en un territorio y en un tiempo comprendido entre el mínimo y el máximo del período de incubación o de latencia, podrá ser considerada, asimismo, indicativa .

Como ya se ha mencionado previamente, la posibilidad de investigar este tipo de brotes es escasa, y se nos ha brindado esta posibilidad excepcional para poder intentar realizar estas estimaciones. Es evidente que al estar frente a un brote, hasta que este fue declarado, pasaron ciertos meses, y como siempre, esto conlleva limitaciones asociadas a la imposibilidad de un diseño anticipado de los estudios, pero esto no ha impedido realizar la recolección de una enorme cantidad de datos, muestras y la realización de un seguimiento durante un largo periodo de tiempo.

3. ***Descripción del cuadro clínico y evolución de los pacientes que han desarrollado la enfermedad durante el estudio.***

Uno de los objetivos de esta tesis es analizar la expresión clínica de la leishmaniasis visceral en pacientes coinfectados Leishmania/VIH. El espectro clínico y el tipo de evolución de los pacientes coinfectados ha ido variando a lo largo de las décadas.

La introducción del HAART supuso un descenso en el número de casos, y lo que se ha evidenciado con el paso del tiempo es que nos encontramos ante un tipo diferente de pacientes que aquellos diagnosticados en las décadas de los años 80-90'.

En los últimos años es difícil conseguir un gran número de pacientes coinfectados para hacer estudios con gran potencia estadística. De hecho, muchos de los estudios publicados hasta ahora, precisan la realización de estudios multicéntricos, por ejemplo, el estudio publicado en el JAC en 2003 con más de 15 hospitales implicados (136) que consiguieron reclutar 57 pacientes desde 1997-1999. Otros estudios consiguieron reclutar durante 13 años 155 pacientes en 16 hospitales en toda Europa (157) y siempre teniendo en cuenta que son estudios realizados hasta el 2001, que comprenden las décadas de los años 90', donde todavía no estaba completamente implantadas las terapias TARGA, y existían mayor número de casos de leishmaniasis visceral notificados.

Estudios realizados más recientemente, como el de Bourgeois en el año 2008 (158), se consigue el seguimiento de 28 pacientes coinfectados entre el periodo de 1995-2004. Con estos datos quiero resaltar que el hecho de que en el mismo hospital se hayan producido 16 casos de pacientes coinfectados durante 5-6 años, es un número de casos muy elevado, explicado por la aparición del brote que estamos estudiando.

Este contexto excepcional permite que una parte de nuestro estudio describa la clínica de estos pacientes, sus características y evolución. Esto es de gran interés, ya que

estas características difieren en muchas ocasiones del paciente “prototipo” que existía hasta ahora de pacientes coinfectados en Europa.

Como veremos más adelante, existe una proporción importante de pacientes de origen africano, migrantes, y esto encaja con el nuevo espectro de paciente diagnosticados de VIH en nuestro país, que en la última década está cambiando de manera muy importante. Es por tanto muy interesante observar la presentación clínica y su evolución en nuestra cohorte, ya que se trata de casos diagnosticados desde el 2009.

Tras el seguimiento de nuestros pacientes podemos observar si la presentación clínica ha ido cambiando conforme cambia el patrón del contagio de VIH. Se observa la evolución durante el curso de la enfermedad con la diferente sintomatología presentada, su evolución a lo largo de estos 6 años durante el seguimiento, los efectos adversos de los fármacos utilizados, la presencia de recaídas con sus diferentes presentaciones clínicas y los diferentes tratamientos utilizados y su eficacia.

Todo esto se analiza en un contexto europeo y en los últimos años, lo que puede aportar una información única y muy importante para la mejor comprensión de esta enfermedad y su expresión en la coinfección, lo que enlaza con el siguiente objetivo de la tesis que se desarrolla a continuación.

4. *Comparativa del cuadro clínico, pruebas diagnósticas e inmunológicas entre pacientes inmunocompetentes, VIH y en tratamiento inmunosupresor*.

Una de las posibilidades que nos ha brindado el estudio de este brote, es poder realizar una comparación de varios aspectos; el cuadro clínico, las sensibilidades y especificidades de las pruebas diagnósticas, la respuesta al tratamiento, y la variación de las pruebas inmunológicas entres tres grupos de pacientes muy diferentes: inmunocompetentes, pacientes VIH y pacientes bajo tratamiento inmunosupresor.

Dentro de las pruebas diagnósticas que hemos realizado durante nuestro estudio, están pruebas serológicas, PCR, cultivo… pero cabe destacar como hemos mencionado previamente que no existe en la actualidad un marcador de curación que permita establecer con cierta seguridad que el paciente no presentará recaídas futuras.

En este sentido, uno de los objetivos que más nos interesaban era comprobar si el análisis de la respuesta celular linfoproliferativa frente a estimulación con antígeno soluble de leishmania (SLA) puede ofrecernos información sobre el estatus inmunitario de un paciente frente a Leishmania infantum. Esto quiere decir, que valoraríamos si un paciente ha estado expuesto pero ha presentado una buena respuesta celular específica que ha impedido enfermar, si un paciente que ya ha presentado leishmaniasis visceral ha conseguido tras el tratamiento (tanto el específico como el TARGA) desarrollar una buena respuesta inmunitaria específica, etc. Como ya se ha comentado previamente, uno de los grande problemas en la práctica clínica, en los pacientes coinfectados, es saber cuándo se debe instaurar una profilaxis secundaria y si se inicia, cuándo poder retirarla, en este sentido, pensamos que esta herramienta puede ser muy útil en el futuro.

Este objetivo es compartido con las tesis de los doctorandos Luis Horrillo Sánchez de Ocaña (cuya tesis versa sobre el impacto del brote en pacientes inmunocompetentes) y Belén

Matía Hernando (cuya tesis versa sobre el impacto del brote en pacientes en tratamiento inmunosupresor con antiTNF).

5. *Determinación de factores de riesgo para el desarrollo de leishmaniasis en subpoblaciones (coinfección con VHC, raza negra...)*

El siguiente objetivo de nuestro estudio ha sido determinar factores de riesgo o grupos con mayor susceptibilidad para desarrollar leishmaniasis visceral, y con mayor posibilidad de presentar peor pronóstico. En el momento actual, no existen estudios que valoren a pacientes con coinfección VIH/VHC o VHB, y que posteriormente desarrollen leishmaniasis visceral.

En España, y también en el resto del mundo, no es infrecuente que los pacientes VIH también sean VHC o VHB positivos(159)(160). Dado que ambos virus presentan unas vías de contagio que son iguales (sexual, vertical y parenteral), no es de extrañar el número de casos que existen. Dependiendo del área geográfica existen tasas de prevalencia diferentes, por ejemplo en Estados Unidos se habla de entre un 15-30% de coinfectados VIH/VHC. En la cohortes Europeas (EuroSIDA), apuntaban a un 33% de los pacientes coinfectados. Y si nos ocupamos de los pacientes cuya vía de transmisión ha sido ADVP, este supera el 75% de los pacientes (161).

Con respecto al VHB, resaltar que existen más de 400 millones de personas infectadas en el mundo. Se cree que un 5% de la población mundial es portadora del virus. El contagio de este virus en pacientes VIH, comporta mayor probabilidad de cronificación, pero aún con este mayor riesgo, se sigue cronificando menos que el VHC.

En España se estima que existen unos 5.000-10.000 personas coinfectadas, aunque esta tendencia está a la baja, fundamentalmente por el aumento sistemático de la vacunación en la población.

Por lo tanto, es interesante intentar objetivar si dicha condición predispone a una peor evolución, y si se observa que los pacientes que presentan coinfección con el virus de la hepatitis C o B presentan mayor tendencia a desarrollar leishmaniasis visceral. Además, hay que tener en cuenta que en el momento actual estos pacientes están comenzando a tratarse con nuevos fármacos no utilizados hasta ahora, y que los tratamientos para leishmaniasis visceral, en ocasiones pueden ser muy tóxicos en pacientes con problemas hepáticos preexistentes.

Otro aspecto importante que en nuestra experiencia sería interesante profundizar, es la existencia de cierta predisposición a padecer leishmaniasis visceral en pacientes de raza negra. Existen ya estudios sobre la susceptibilidad genética de ciertas razas/etnias para padecer unas enfermedades u otras, o para reaccionar de manera diferente(162). Todos estos estudios están vinculados a las diferentes expresiones de diferentes complejos de histocompatibilidad en diferentes individuos o grupos étnicos(163)(164)(165). Nuestro interés en abordar este aspecto derivó del hecho de que en nuestra cohorte de enfermos de leishmaniasis visceral (tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos) había una gran proporción de enfermos de raza negra, de diversos orígenes (africanos, dominicanos, etc). Además, en los diversos estudios que se han realizado a nivel mundial, llama siempre la atención que los porcentajes de curación son menores y que los perfiles clínicos de la enfermedad son más severos. Evidentemente existen una gran cantidad de explicaciones para este hecho, desde el mayor grado de desnutrición de los pacientes, a el hecho de que en África sea L. d*onovani* la causante de los casos y por tanto pueda presuponerse que es más agresiva, etc… Debido a todas estas causas nos resultaba interesante ver si existe alguna diferencia en la evolución, presentación clínica, etc, en este grupo de pacientes.

6. *Validar la utilidad del test de linfoproliferación a SLA como marcador de curación que permita la retirada de la profilaxis secundaria en pacientes con test positivo.*

Como ya mencionamos, nuestra hipótesis se basa en que en aquellos pacientes con menos de 200 cel/µl CD_4^+ que presentaran una buena respuesta celular específica frente a SLA, se podría suspender la profilaxis de manera segura (o no iniciarla) y se podrían considerar pacientes curados.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

I. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional longitudinal de una cohorte prospectiva de pacientes, con recogida retrospectiva de datos. La población del estudio comprendió la cohorte de pacientes VIH en seguimiento en el Hospital Universitario de Fuenlabrada.

Se seleccionaron los pacientes de entre todos los pacientes que acudieron de forma consecutiva a nuestra consulta de Enfermedades Infecciosas/VIH durante los años de duración del estudio (inicio en enero de 2013 hasta el 31 de diciembre 2015), durante el cual se extrajeron muestras de 135 pacientes, según unos criterios de inclusión y exclusión que se detallan más adelante.

Las visitas se llevaron a cabo en las consultas del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario de Fuenlabrada y la extracción de muestras sanguíneas también se realizaron en el mismo centro.

Se enviaron dichas muestras a la Unidad de Leishmaniasis y Chagas en el Centro Nacional de Microbiología en el Instituto de Salud Carlos III donde habitualmente son procesadas este tipo de muestras ya que en nuestro hospital no existen las instalaciones ni el personal necesario para realizar este tipo de análisis.

Los pacientes que presentaron enfermedad (leishmaniasis visceral) y por lo tanto requirieron la extracción de más de una muestra, donaron su consentimiento por escrito (Anexo 1). El resto de pacientes asintomáticos a los que se les realizó la extracción de una muestra para comprobar su exposición, donaron su consentimiento de manera verbal tras ser informados por sus médicos habituales o por mí misma.

2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE FUENLABRADA Y SU POBLACIÓN VIH

Fuenlabrada es un municipio situado en el sur de Madrid. En 2011 ocupaba la cuarta posición en cuanto a tamaño de la población de la comunidad de Madrid, tras Madrid capital, Móstoles y Alcalá de Henares. Según el INE de 2014, en el padrón municipal constaban 195 864 habitantes y una densidad de población de 4969,91 hab./km². En un corto periodo de tiempo, pasó de tener 18,442 habitantes en el año 1975 a 212,395 habitantes en 2001, con un crecimiento del 874,6 por ciento. La población del municipio se reparte entre las poblaciones de Fuenlabrada (170 018 hab.) y Loranca (28 114 hab.).

Figura 15. Evolución de la población desde 1960-2011 (Datos del censo Ayunt. Fuenlabrada).

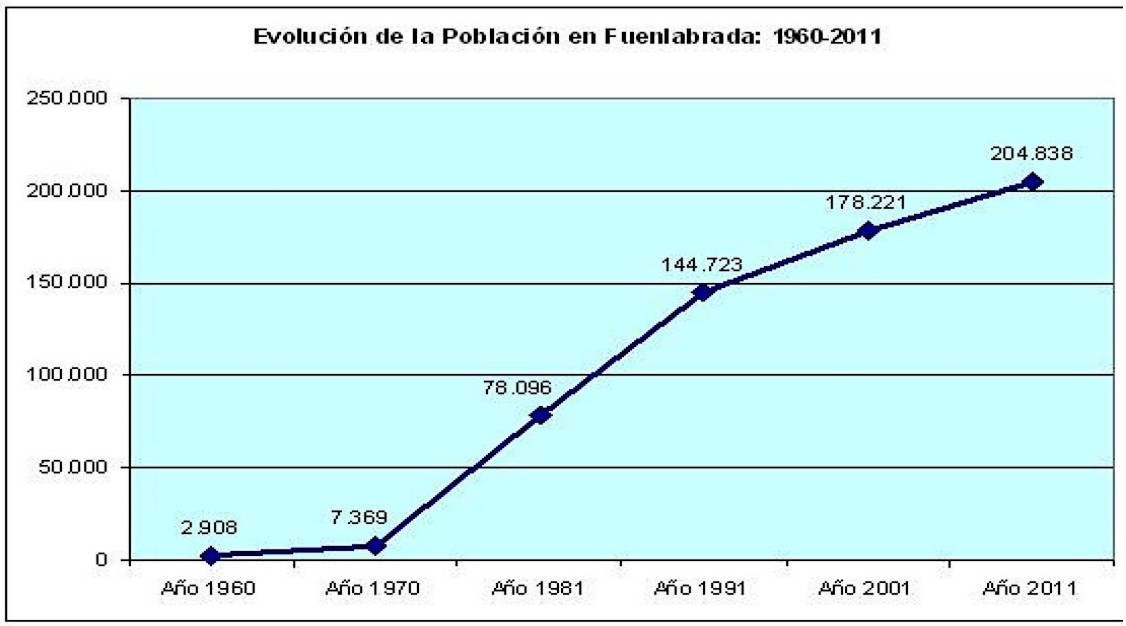


Gráfico de la evolución de la poblaciónde Fuenlabrada desde 1960 hasta 2011

Es una población muy joven, debido principalmente a un proceso de migración muy importante durante los años 80 con la llegada de muchos jóvenes que se instalaron en este

municipio. El 40,19% de su población es menor de 20 años, y la tasa de ancianos es del 6,59%, con una relación jóvenes-ancianos de 6,1.

En el siguiente gráfico (datos públicos del censo del ayuntamiento Fuenlabrada) se puede observar una pirámide poblacional con un predominio de población entre los 25 y los 60 años.

Figura 16. Población de Fuenlabrada 2011(Datos del censo Ayunt. Fuenlabrada).

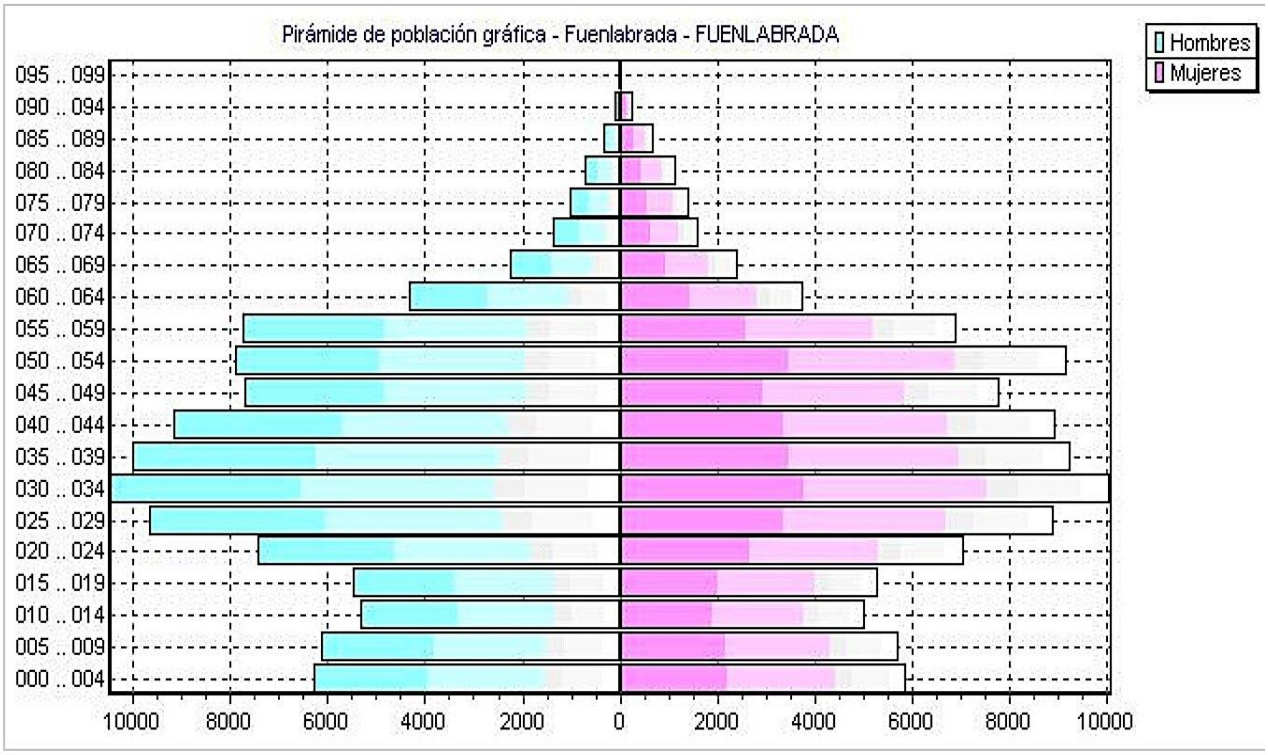
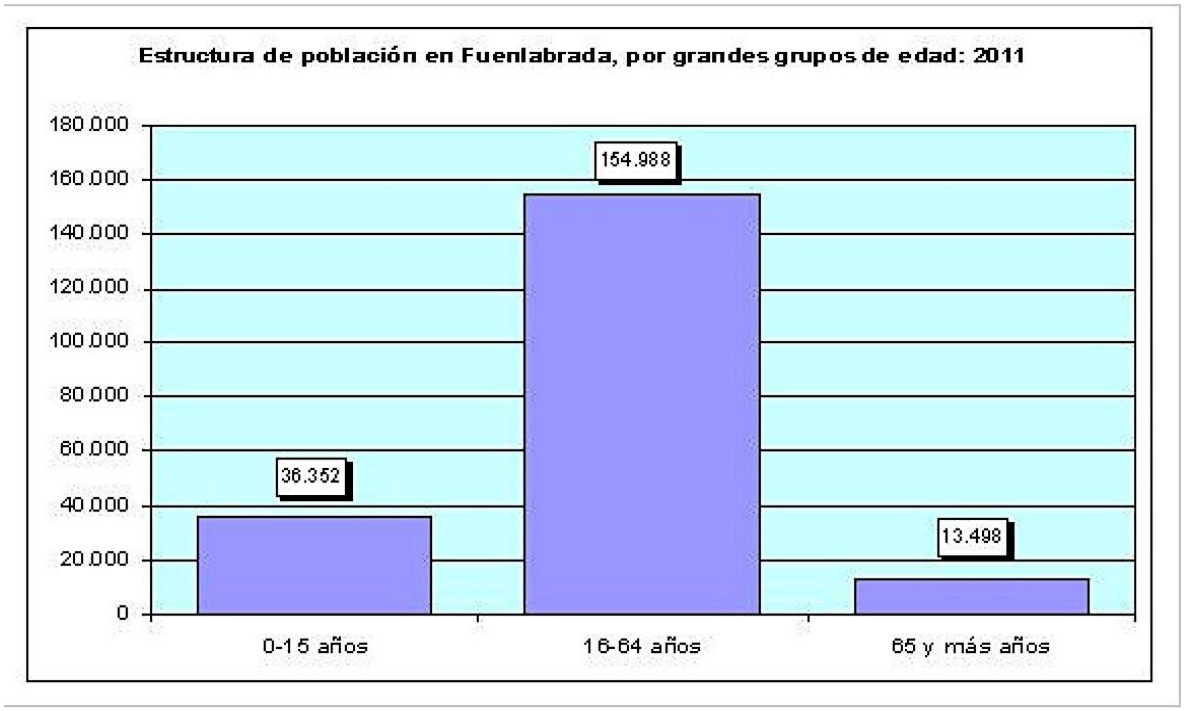


Gráfico de la población de Fuenlabrada en enero de 2011

Por lo tanto se trata de una de las poblaciones más jóvenes de toda la comunidad de Madrid lo que le confiere al Hospital de Fuenlabrada unas características particulares que influyen mucho en el tipo de patologías que se tratan en el hospital.

Figura 17. Estructura poblacional por grupos de edad (datos del censo Fuenlabrada)



Estructura de la población por grupos de edad

Además en este área existe una gran cantidad de población migrante, unas 25.303 personas censadas en el año 2016, con una importante representación de población africana principalmente procedente de Marruecos (4.200 habitantes), Guinea Ecuatorial (1.094 hab.) y Nigeria (2.300 hab.), lo cual es un dato demográfico muy importante, ya que modifica mucho el perfil de los nuevos diagnósticos de VIH que se realizan en el hospital, y que de manera bastante frecuente, se realizan en pacientes provenientes de Nigeria y Guinea Ecuatorial. En la siguiente tabla se pueden observar con más detalle el número exacto y que porcentaje suponen de la población de Fuenlabrada según los datos facilitados por el ayuntamiento a fecha de enero 2016.

Figura 18. Distribución de población inmigrante (datos del censo Fuenlabrada).

Nacionalidad	Hombres				Mujeres				Total		
	Número	%T.País	%T.Hom.	% Total	Número	%T.País	%T.Muj.	% Total	Número	%T.Pais	% Total
220 GUINEA ECUATORIAL	461	42,14	3,47	1,82	633	57,86	5,27	2,50	1.094	100,00	4,32
221 KENIA	0	0,00	0,00	0,00	2	100,00	0,02	0,01	2	100,00	0,01
223 LIBERIA	4	80,00	0,03	0,02	1	20,00	0,01	0,00	5	100,00	0,02
224 LIBIA	4	80,00	0,03	0,02	1	20,00	0,01	0,00	5	100,00	0,02
226 MALAWI	0	0,00	0,00	0,00	2	100,00	0,02	0,01	2	100,00	0,01
227 MALI	10	76,92	0,08	0,04	3	23,08	0,02	0,01	13	100,00	0,05
228 MARRUECOS	2.487	59,14	18,72	9,83	1.718	40,86	14,30	6,79	4.205	100,00	16,62
234 NIGERIA	1.306	56,27	9,83	5,16	1.015	43,73	8,45	4,01	2.321	100,00	9,17

2.1 El Hospital de Fuenlabrada

El Hospital de Fuenlabrada se inauguró en 2004 y es el hospital de referencia para el área sanitaria 9. Actualmente tiene unas 400 camas, y su población asignada es de unos 221.000 pacientes, que proceden de las diferentes poblaciones que atendemos (figura 18).

Fuenlabrada cuenta además con ocho centros de salud que atienden a la población, y por su distribución geográfica, los más cercanos a las zonas del brote son el Centro de salud de Castilla la nueva, el centro de salud de Alicante y el de Cuzco. En la figura 19 se pueden observar la población asignada a cada centro de salud, objetivándose la cantidad de población entre 15 y 65 años susceptible en la época del brote.

Figura 18. Población asignada al Hospital de Fuenlabrada(Datos públicos del Hospital de Fuenlabrada)

POBLACIÓN ASIGNADA

Poblaciones de referencia de la Comunidad de Madrid y de la población asignada. Por sexo, municipios.

	Total	Hombres	Mujeres
Comunidad de Madrid	6.498.560	3.130.241	3.368.319
Fuenlabrada	198.132	99.189	98.943
Humanes de Madrid	18.870	9.624	9.246
Moraleja de Enmedio	4.984	2.496	2.488
Total	**221.986**	**111.309**	**110.677**

Fecha de referencia: 1 de Enero de 2012

Fuente: Instituto Nacional de Estadística (INE)

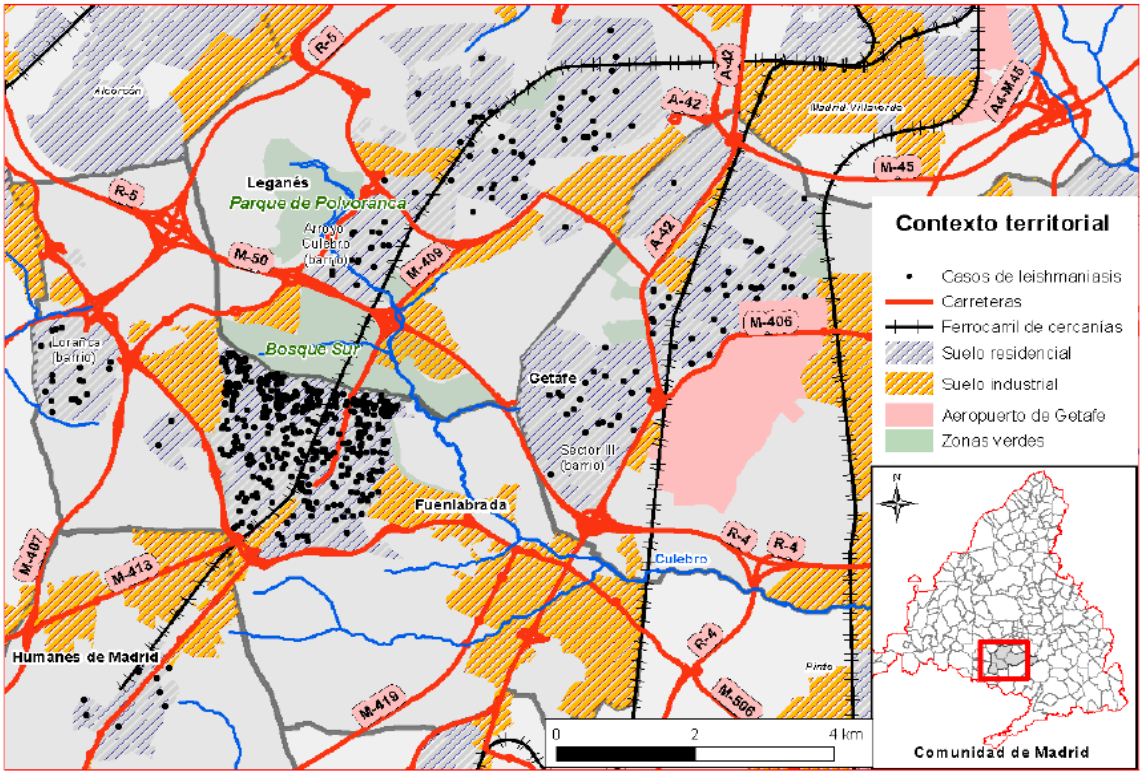
Figura 19. Población asignada a los diferentes centros de Salud de Fuenlabrada.

Población asignada

		POBLACIÓN (31/12/2012)			
NOMBRE CENTRO	LOCALIDAD	<14	14-64	>=65	Total
C.S. ALICANTE	FUENLABRADA	4.201	20.477	2.471	27.149
C.S. CASTILLA LA NUEVA	FUENLABRADA	3.321	19.593	1.541	24.455
C.S. CUZCO	FUENLABRADA	3.244	18.804	2.002	24.050
C.S. EL NARANJO	FUENLABRADA	2.725	15.509	1.598	19.832
C.S. FRANCIA	FUENLABRADA	4.853	28.940	2.928	36.721
C.S. HUMANES	HUMANES	4.947	16.968	1.772	23.687
C.S. PANADERAS	FUENLABRADA	6.469	27.523	3.203	37.195
C.S. PARQUE LORANCA	FUENLABRADA	7.907	20.410	1.125	29.442
	TOTAL	37.667	168.224	16.640	222.531

Las áreas más afectadas durante el brote de leishmaniasis visceral fueron las zonas adyacentes al parque de Bosque Sur, situado al norte de la ciudad. Durante los comienzos del brote, se observó una clara concentración espacial de los casos en el norte del casco urbano, sobre todo en las zonas limítrofes con suelo que no era edificado. En el resto de municipios (Getafe, Leganés y Humanes) no se ha encontrado ningún patrón de concentración espacial.

Figura 20. Población asignada al Mapa extraído del informe técnico de la dirección de Salud pública de la Comunidad de Madrid donde se observa la distribución de los casos según la residencia de los pacientes desde 2009-2015.



Este patrón ha ido evolucionando con el tiempo, y de hecho a partir de 2014, los casos se encontraban más dispersos, perdiéndose este componente de concentración espacial.

2.2 Población VIH en el Hospital de Fuenlabrada

Nuestro hospital tiene un Servicio de Medicina Interna y formando parte de él, se encuentra el Área de Enfermedades Infecciosas en cuyas consultas se han ido reclutando a los pacientes. Desde 1 de enero de 2005 hasta 31 de diciembre de 2015, un total de 583 pacientes VIH han sido atendidos en nuestras consultas. De ellos, 49 han fallecido y 212 no han acudido a consulta en el último año, por lo que 321 se consideran en seguimiento durante 2015 (al menos una consulta durante el año). Desde el 1 de Enero de 2005 hasta el inicio del brote (1 de Junio de 2009) el total de pacientes VIH que acudió a nuestras consultas fue de 345, y desde el inicio del brote hasta el fin del estudio (31 de Diciembre de 2015), el total de pacientes atendidos han sido de 462. Por otro lado, según los datos aportados por nuestro servicio de Medicina Preventiva, que consultó los registros de la Comunidad de Madrid existentes sobre VIH, constan 704 pacientes VIH diagnosticados en el área de Fuenlabrada desde la creación de los registros en 2007.

Respecto a la cohorte de pacientes VIH en seguimiento (321), el 70% son hombres, la edad media al diagnóstico fue de 31 años, el 32% son inmigrantes y el 21% son inmigrantes de origen subsahariano.

En general los pacientes de nuestro hospital se encuentran bien controlados. La mayoría realiza tratamiento TARGA y está con carga viral indetectable, como se puede ver en la dos siguientes tablas.

Hasta 31 de diciembre de 2015 estos son los datos de nuestras consultas:

Tabla 4. Total de pacientes en seguimiento por año y ratio de visitas.

Año	Total pacientes en seguimiento	Ratio visitas/paciente	Nuevos/año
2005	87	3.53	64
2006	140	3.39	70
2007	177	3.11	59
2008	203	3.25	52
2009	230	3.03	48
2010	232	2.93	37
2011	253	3.02	39
2012	265	2.77	31
2013	290	2.92	40
2014	310	3.02	31
2015	321	2.39	20

Tabla 5. Cantidad de pacientes en tratamiento y control de cargas virales.

	En tratamiento	Sin tratamiento	Carga viral < 50 (%)
31.12.13	277	13	76.4
31.12.14	293	17	91.1
31.12.15	321	6	94.6

Se puede observar, por lo tanto, que son pacientes con muy buen control y carga viral indetectable en la inmensa mayoría de ellos. Así pues, el perfil VIH de nuestro hospital es similar a la del resto de España durante la última década, salvo por la mayor proporción de pacientes africanos, especialmente subsaharianos.

3. SELECCIÓN DE SUJETOS

Para la selección de los participantes, se consideraron potencialmente reclutables todos los pacientes que acudieran a nuestra consulta de Enfermedades Infecciosas/VIH durante los años de duración del estudio (enero 2013 hasta diciembre 2015).

A) CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Mayor de 18 años con infección crónica por VIH

- Haberse realizado al menos una analítica y haber realizado al menos, una visita en nuestra consulta de Enfermedades Infecciosas/ VIH.

- Conceder su consentimiento por escrito en el caso de los pacientes enfermos, y verbal en el caso de los pacientes en seguimiento en la consulta, para participar en el estudio.

B) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Paciente que aun acudiendo a consulta no tuviera al menos una analítica con $CD4^+$ y carga viral durante el primer año de duración del estudio.

- Paciente que no donara su consentimiento y no quisiera participar en el estudio.

4. VARIABLES DE ESTUDIO

a) Evento principal: Enfermo de leishmaniasis visceral, definido como paciente sintomático en relación con infección documentada por Leishmania (se requiere visualización al microscopio de Leishmania, aislamiento de Leishmania por cultivo o detección de DNA de Leishmania por PCR en cualquier órgano o en sangre); o bien serología positiva usando técnicas basadas en rK39 (técnica cualitativa) o IFI (superior a dilución 1/40).

b) Variables secundarias:

- Paciente con exposición a Leishmania: definido como paciente con infección documentada por Leishmania (visualización al microscopio de Leishmania, aislamiento de Leishmania por cultivo o detección de DNA de Leishmania por PCR en cualquier órgano o en sangre); o bien serología positiva usando técnicas basadas en rK39 (técnica cualitativa) o IFI (superior a dilución 1/40); o bien que presenta respuesta celular positiva para Leishmania.

- Paciente con exposición a Leishmania asintomático: paciente que cumple la definición de exposición previa y está asintomático.
- Paciente con exposición a Leishmania y alto riesgo de padecer leishmaniasis visceral: paciente que cumple la definición de exposición previa y que además presenta respuesta celular específica para Leishmania negativa.

- Paciente con exposición a Leishmania y bajo riesgo de padecer leishmaniasis visceral: paciente asintomático, en el que no se detecta Leishmania (no visualización al microscopio de Leishmania, cultivo negativo o detección de DNA de Leishmania por

PCR en cualquier órgano o en sangre negativa) y que además presenta respuesta celular específica para Leishmania positiva.

- Paciente enfermo: clínicamente sintomático.
- Paciente curado: asintomático, y SIN PROFILAXIS.
- Paciente suprimido: asintomático pero CON PROFILAXIS.
- Paciente NO curado: paciente enfermo o paciente suprimido.

c) Covariables: Edad, sexo, raza, comorbilidades asociadas, tiempo de duración de infección VIH, factor de riesgo VIH, cifra de CD4, carga viral, tipo y duración de tratamiento antirretroviral.

5. PRUEBAS LABORATORIO REALIZADAS

Se realizaron en el contexto de la práctica clínica habitual, hemograma, bioquímica básica con perfil hepático, $CD4^+$ y carga viral. Además, a los pacientes enfermos de leishmaniasis visceral se les realizaron otras determinaciones como proteína C reactiva, ferritina, VSE y LDH. Estas pruebas se realizaron en el laboratorio del Hospital de Fuenlabrada.

Se realizaron también en nuestro centro ecografía o TAC abdominal para determinar la presencia de hepatoesplenomegalia, así como aspirado o biopsia de médula ósea en el caso de los pacientes enfermos, dentro del proceso habitual de diagnóstico de esta enfermedad que requiere confirmación histológica o serológica, como hemos mencionado previamente.

Parte de los análisis más específicos no se podían realizar en nuestro hospital dada su complejidad y la necesidad de formación específica en este ámbito, por lo que se mandaban en el mismo día de la extracción sanguínea al laboratorio de la Unidad de Leishmaniasis y Chagas en el Centro Nacional de Microbiología en el Instituto de Salud Carlos III.

5.1 Exámenes parasitológicos

5.1.1 Cultivos en medio NNN

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

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron resuspendidas en NET-10 y se cultivaron en medio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) 50 µl/muestra. Los cultivos se mantuvieron en estufa a 27oC de temperatura y fueron examinados, cada 7 días, mediante microscopía para determinar la presencia/ausencia de parásito. La muestra fue considerada negativa cuando no se observaron promastigotes tras 28 días de cultivo.

5.2 Aislamiento de ADN genómico y PCR en tiempo real:

El aislamiento de ADN genómico y la PCR en tiempo real o qPCR se realizaron según descrito por Cunha et al. Se obtiene el ADN genómico a partir de 100 µl de sangre con anticoagulante citrato-EDTA, mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol (Maizels y col., 1991). El ADN precipitado se resuspende en agua destilada estéril ajustando la concentración a 10 ng/µl ($5x10^4$ parásitos/µl), tras lectura espectrofotométrica a 260 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, USA). La detección del parásito se realizó mediante un protocolo de PCR nested específica del género Leishmania. Esta técnica se caracteriza por tener una gran sensibilidad al contar con dos pasos de amplificación y una alta especificidad al utilizar dos parejas de cebadores o primers distintos en cada paso. La diana de la reacción de amplificación es la región variable del gen que codifica el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma que presenta un bloque de secuencia que es conservado para todo el género Leishmania, al mismo tiempo que presenta diferencias con otros organismos (Meredith y col., 1993; Simpson y col., 2002). De este modo, la LnPCR permite amplificar todas las especies de Leishmania de manera específica sin obtener resultados positivos falsos.

PCR cuantitativa: Para cuantificar la carga parasitaria se realizó una técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello se empleó el termociclador de alta velocidad LightCycler

(Roche Diagnostics, España) y el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, España).

5.3 Estudio de la respuesta inmune

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

5.3.1 Determinación de la respuesta inmune humoral

- Inmunofluorescencia indirecta (IFI):

Los análisis se realizaron con las muestras de plasma utilizándose una suspensión de promastigotes de L. infantum (MHOM/FR/1978/LEM-75) fijados en un portaobjetos mediante acetona. En cada portaobjetos se incluye un control negativo y positivo. Tras una incubación de 30 minutos en una cámara húmeda a 37ºC, se realizaron tres lavados con PBS a temperatura ambiente mediante agitación ligera y posteriormente se procede a realizar diluciones desde 1/20 hasta 1/640 para determinar los niveles totales de IgG. Para esto, se utiliza el anticuerpo anti-IgG canino conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ICN, Biomedical Incorporation, USA) y el colorante azul de Evans (Sigma, USA), diluidos 1/150 y 1/1000 respectivamente.

La observación se realizó mediante un microscopio de fluorescencia (Dialux 20EB, Leitz, Alemania), estimándose la prueba como positiva cuando la muestra presentó un título de anticuerpos superior a 1/80.

- Inmunoensayo enzimático (ELISA):

Se realizó la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos frente al antígeno rK39 y SLA en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc, Dinamarca). La sensibilización de las placas se hizo diluyendo los antígenos en tampón carbonato (Na_2CO_3 15 mM, $NaHCO_3$ 28 mM, pH 9.6), empleando rK39 y SLA en cada pocillo. Tras la incubación durante toda la noche a 4ºC, las placas se bloquearon durante una hora con 200 µl de PBS-Tween 20 (PBS-T) al 1% en el caso de rK39 y PBS-T al 0.3% con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% para SLA. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se procede al lavado de las placas con PBS-T al 0.1% cinco veces. A continuación se añaden 50 µl de los sueros a analizar y transcurrida una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se procede al lavado de las placas según describimos anteriormente.

Las muestras se incubaron con la proteína A conjugada con peroxidasa (Zymed Laboratories Incorporation, USA) diluida en PBS-T al 0.1% 1/8000 durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavando a continuación. Se añadió el sustrato ácido benzotiazolina-azino-sulfónico (ABTS) siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma, USA) y la reacción se detuvo con dodecil sulfato sódico (SDS, Sigma, USA) al 5%, realizándose la lectura a una absorbancia de 405 nm mediante un espectrofotómetro para placas ELISA (Merk ELISA System MIOS, Merk, Alemania).

- rK39-ICT: Se tratan de unos “Dipsticks”, que se compraron a los laboratorios Leti, y fueron realizados según las instrucciones del manufacturador.

5.3.2 Determinación de la respuesta inmune celular: Técnica de linfoproliferación

- Obtención del Antígeno soluble de Leishmania: El antígeno soluble de Leishmania se obtiene a partir de una cultivo de promastigotes en fase estacionaria de la cepa: JPC strain,

MCAN/ES/98/LLM-722 de L. *infantum*. Se realizan lavados consecutivos en PBS (phosphate-buffered saline), tras obtener el cultivo. El precipitado celular obtenido se procesa siguiendo el protocolo descrito por Scott y col. (1987). Se centrifuga a 1000 g durante 20 min a 4°C. Posteriormente se vuelve a suspender en un buffer de lisis (50 mM Tris/5 mM EDTA/HCl, pH 7) realizándose tres ciclos de congelado/descongelado rápido seguido por tres pulsos con un sonicador durante 20 segundos a 40w. La solución se centrifuga a 27000 g durante 20 minutos a 4ºC y el sobrenadante es alicuotado y almacenado a -80ºC hasta su uso. La composición del homogeneizado se comprueba mediante electroforesis SDS-PAGE, y la determinación de la concentración proteica se realizó mediante la prueba del ácido bicinconínico (BCA, Protein assay reagent, Pierce Chemical Company, USA).

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

bromodeoxiuridina utilizando el “Cell Proliferation Biotrak ELISA kit” (General Electric Healthcare Life Sciences, UK).

El precipitado obtenido de PBMCs se resuspendió en 5 ml de medio ACK (NH_4Cl 155 mM, $KHCO_3$ 100 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2) y se incubó durante 5 minutos a 4ºC. Posteriormente, se añadió PBS hasta un volumen aproximado de 50 ml y se centrifugó a 800g durante 10 minutos a 4ºC. Tras otro lavado con PBS, las células se resuspendieron en 5 ml de medio completo, y se tomó una muestra de 15 µl para realizar el recuento celular en cámara de Neubauer.

Para determinar el aumento de la proliferación celular inducida por la estimulación de un antígeno específico o un mitógeno, empleamos el kit comercial Biotrack (Amersham Biosciences, Reino Unido) que cuantifica la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Los resultados se muestran como índice de estimulación (SI) para SLA, índice que se calcula dividiendo el resultado de linfoproliferación de la muestra del paciente estimulada con SLA frente al control. El punto de corte o cutt off para considerar una respuesta linfoproliferativa frente a SLA positiva se calculó como la media + 3 DS del índice de estimulación (SI) para 51 pacientes VIH expuestos a leishmania pero no enfermos, y fue un SI de 1.71+/- 10%. Por lo tanto se considero positivo por encima de 1.88 y dudoso entre 1.53 y 1.88 por lo que en caso de estar en este rango, se repetía la muestra para asegurar un resultado positivo o negativo.

6. ESTRUCTURA DEL ESTUDIO

Cálculo del tamaño de la muestra: De todos nuestro objetivos, uno de los parámetros que más nos interesaba era comprobar la proporción de pacientes expuestos SLA positivos. Para realizar el cálculo de la muestra, estimamos una prevalencia en torno a un 15%. Realizando una cálculo para unos 430 pacientes, con un nivel de confianza 95% y una precisión del 5%, estimando que tendríamos una proporción de positivos del 15%, el tamaño maestral necesario para estimar una proporción salía de 135.

Bases de datos: Para conseguir analizar los diferentes objetivos de nuestro estudio, hemos manejado varias bases de datos. En la primera base de datos, se encuentran recogidos todos los pacientes VIH que han sido atendidos en nuestro hospital desde 1 de enero de 2005 hasta 31 de Diciembre de 2015, un total de 583 pacientes. En esta base de datos, encontramos todas las características epidemiológicas, clínicas, analíticas, de tratamiento y evolución del VIH así como las características clínicas, analíticas y de tratamiento de los episodios de leishmaniasis visceral en aquellos pacientes que tuvieron coinfección.

De este grupo de pacientes se seleccionaron 135 pacientes para extracción de muestras de sangre donde realizar los estudios parasitológicos y de respuesta inmunológica humoral y celular, incluyendo enfermos de leishmaniasis visceral y asintomáticos. De los 135 pacientes, 123 corresponden a pacientes asintomáticos para leishmaniasis ("controles") y 12 a pacientes que habían padecido leishmaniasis, 10 visceral y 2 cutánea.

Para comprobar que nuestra muestra de 123 pacientes "controles" VIH con estudio completo, y los pacientes enfermos (12), era representativa, y que no existía ninguna diferencia a nivel epidemiológico ni en el nivel de inmunodepresión, distribución de edad, sexo, etc se realizó un test de homogeneidad comparando la muestra de los 135 pacientes con

estudio completo frente a los 430 de la cohorte que no fueron estudiados. El test de homogeneidad demostró que nuestra muestra de pacientes a los que se realizaron los estudios parasitológicos y de inmunidad no se diferenciaba del resto de pacientes VIH en ninguna característica recogida. Las características de ambas muestras y la comparación de las variables se detallan en ANEXO I.

En una segunda base de datos se incluyeron todos los resultados de los test de respuesta celular, respuesta humoral y test parasitológicos que se han realizado sobre cada muestra extraída a los 135 pacientes reclutados. En los 123 pacientes "controles" se repitió el test en los casos con resultado de SLA dudoso (SI entre 1.53 y 1.88), disponiendo de un total de 158 muestras de este grupo de pacientes.

En los 12 pacientes enfermos y tratados se incluyeron los test trimestrales durante el seguimiento, disponiendo en total de 56 muestras.

Por último, manejamos una base de datos con todos los datos clínicos, analíticos y de tratamiento, de los pacientes enfermos de leishmaniasis visceral atendidos en nuestro centro (143), ya fueran pacientes inmunocompetentes, pacientes VIH o en tratamiento con anti-TNF.

Prevalencia: Para estimar la prevalencia de exposición a Leishmania infantum en pacientes VIH en zona de alta endemia, se calculó la prevalencia de exposición en base a la definición de paciente "expuesto" en nuestra cohorte de 135 pacientes con el estudio completo realizado. Nuestra definición de paciente "expuesto" a Leishmania se realizó en base los criterios citados anteriormente que se pueden ver resumidos en la siguiente tabla:

Paciente con exposición a Leishmania definido como paciente con infección documentada:

- Visualización al microscopio de Leishmania
- Aislamiento de Leishmania por cultivo.
- Detección de DNA de Leishmania por PCR en cualquier órgano o en sangre.
- Serología positiva usando técnicas basadas en rK39 (técnica cualitativa) o IFI (superior a dilución 1/40)

Para calcular la prevalencia de exposición de toda la población VIH de Fuenlabrada, debemos utilizar como numerador el número total de expuestos, y como denominador el número total de VIH.

El número total de expuestos es la suma de los sintomáticos (todos los enfermos) y los expuestos asintomáticos del total de pacientes en riesgo de exposición. El número total de pacientes sintomáticos (enfermos) diagnosticados desde el 1 de Enero de 2005 hasta el 31 de Diciembre de 2015 ha sido 15; 13 viscerales y 2 cutáneos. Para estimar el número total de expuestos asintomáticos, extrapolamos el porcentaje de expuestos que obtuvimos de nuestra muestra al total de la población VIH de Fuenlabrada que ha estado en riesgo de estar expuesta en el período de estudio, y que estimamos que debe estar entre 583 (nuestra cohorte desde 2005 a 2015) y 704 (total de pacientes VIH registrados por la Comunidad de Madrid residentes en Fuenlabrada) (ver página 88). Estas mismas cifras (583 y 704) la usaremos como denominador para el cálculo de la prevalencia.

Además, se realizó un seguimiento de los pacientes asintomáticos durante el periodo del estudio para valorar el riesgo de caer enfermos de leishmaniasis visceral (evento principal) comparando los grupos de alto y bajo riesgo según las definiciones ya citadas.

Incidencia: Para determinar la incidencia acumulada de la leishmaniasis visceral en pacientes VIH, se tomó como numerador los 13 casos de leishmaniasis visceral diagnosticados desde el 1 de enero de 2005 para el total de la cohorte. De estos 13, 4 se

diagnosticaron antes de la declaración del brote el 1 de junio de 2009 y 9 se diagnosticaron después. Para la incidencia del total del período de seguimiento de la cohorte (1 de Enero de 2005 a 31 de Diciembre de 2015) hicimos una estimación usando como denominadores el total de pacientes de nuestra cohorte desde 2005 a 2015 (583) y el total de pacientes VIH registrados por la Comunidad de Madrid en Fuenlabrada (704) (ver página 88). Para comparar la incidencia antes y después del brote, utilizamos los datos de nuestra cohorte (430 antes del brote y 462 después (ver página 88 y 89).

Hemos utilizado las definiciones de incidencia acumulada y la de tasa de incidencia que se detallan a continuación:

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

$$IA_{(\Delta t)} = \frac{N^{o}\ eventos\ nuevos}{N^{o}\ individuos\ suceptibles\ al\ comienzo}$$

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

La incidencia acumulada no se puede calcular con certeza aplicando esta definición ya que no sabemos el número de individuos susceptibles al comienzo. Nuestra cohorte de seguimiento es muy variable con muchos pacientes que entran (nuevos diagnósticos) y salen (éxitus y abandonos). Hemos utilizado un número estimado, que es el de pacientes de la cohorte de la consulta (583) y de los datos del registro nacional (704), pero no son al inicio de la cohorte sino durante el total de la misma. Para saber el inicio de la cohorte habría que saber cuantos VIH había en Fuenlabrada el 1 de Enero de 2005, y eso es imposible porque no tenemos los datos de nuestra cohorte porque no existía (el hospital estaba recién abierto) y

porque a nivel nacional sólo se declaraban en ese momento los casos de SIDA, no VIH. Lo mismo ocurre con la de antes y después del brote.

Para el cálculo de la tasa de Incidencia necesitamos conocer el período de riesgo de cada paciente. Esto no se puede saber, ya que no se sabe cuando los pacientes han venido y cuando han dejado de vivir en Fuenlabrada, por lo que hemos usado el momento en el que entraron y salieron de la cohorte. Según la base de datos de la cohorte VIH, la suma de los períodos de riesgo de cada uno de los individuos enfermos a lo largo del período que se especifica los calculamos usando el tiempo en años entre la primera y la ultima visita, durante el período total de seguimiento y durante los períodos antes y después del brote.

Descriptivo: Para describir el cuadro clínico y evolución de los pacientes que han desarrollado la enfermedad durante el estudio, se utilizó la base de datos con las características recogidas de los enfermos. Se realizó una descripción observacional de los casos, con sus características clínicas, epidemiológicas, analíticas, etc… de los pacientes con leishmaniasis visceral, y los dos pacientes que han desarrollado leishmaniasis cutánea durante el estudio. También comparamos nuestra muestra con otras cohortes de pacientes coinfectados publicadas hasta ahora.

Posteriormente procedimos a realizar una comparación de las características de los pacientes VIH frente a la evolución y clínica de los pacientes inmunocompetentes y pacientes con otros tipos de inmunodepresión, con el objetivo de intentar establecer si existen diferencias entre estos grupos y su presentación clínica, evolución, etc… Este apartado es un trabajo en común con otras dos tesis que se están realizando en el hospital que analizan el cuadro clínico en pacientes inmunocompetentes y en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor.

Factores de riesgo: Para intentar determinar los factores de riesgo para el desarrollo de leishmaniasis en subpoblaciones tales como los pacientes coinfectados con VHC, raza negra cirrosis o umbral de CD4, utilizamos la base de datos de todas las muestras extraídas, comparando aquellos pacientes expuestos y aquellos pacientes que enfermaron. Se intentaron explorar la mayor cantidad de variables posibles, en relación con características clínicas de los pacientes, cargas virales, que estuvieran en tratamiento o no, la distancia hasta el parque, etc.

Utilidad SLA: Finalmente para validar la utilidad del resultado del test de SLA para la retirada de la profilaxis secundaria, se retiró la profilaxis en los pacientes con respuesta celular al SLA positiva con la definición citada (superior a 1.88) independientemente de su cifra de CD4, y se evaluó la incidencia de recidivas en pacientes con SLA positiva frente a los pacientes con SLA negativa.

7. ANALISIS ESTADISTICO

Empleamos la aplicación estadística SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Las variables cualitativas se caracterizaron mediante la distribución de sus frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas se han ofrecido a través de su media o mediana ± desviación estándar (DE), rango o intervalo de confianza del 95%.

Se llevó a cabo un análisis multivariante mediante regresión logística para determinar la asociación entre las variables primarias y secundarias del estudio, controlando a su vez el efecto de posibles factores de confusión. Se ha fijado un valor de $P < 0{,}05$ como nivel de significación estadística.

8. FINANCIACION

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

IV.RESULTADOS

OBJETIVO 1. Prevalencia de exposición a Leishmania infantum

De la muestra de 135 pacientes con estudio de exposición completo, 31 (22.9 %) cumplían la definición para considerarlos expuestos, y 104 (77,03%), no expuestos. Entre los 123 pacientes asintomáticos para leishmaniasis, 19 de ellos (15.4 %) cumplieron con la definición de expuesto (Figura 21).

Para calcular la prevalencia de exposición de toda la población VIH de Fuenlabrada, debemos calcular como numerador el número total de expuestos, y como denominador el número total de VIH. El número total de expuestos es la suma de los sintomáticos (todos los enfermos) y los expuestos asintomáticos. Los pacientes SINTOMATICOS son 15 (13 de leishmaniasis visceral y 2 de cutánea). Para estimar el número total de ASINTOMATICOS EXPUESTOS, extrapolamos el porcentaje de expuestos de nuestra muestra (15.4 %) al total de la población VIH de Fuenlabrada que ha estado en riesgo de caer enferma en el período de estudio, y que estimamos que debe estar entre 583 pacientes (nuestra cohorte) y 704 pacientes (registro de Comunidad de Madrid). Asumiendo estas cifras, el número total de expuestos asintomáticos VIH de Fuenlabrada debe estar entre 87 (15.4% de 583) y 105 (15.4% de 704); y por tanto el número total de expuestos, que sería la suma de los sintomáticos y asintomáticos, estaría entre 15+87 (102) y 15+105 (120). Usando estos números como numerador, la prevalencia estimada de exposición estaría entre 102/583: 17.5 % y 120/704: 17.0%.

Por tanto:

- Prevalencia de exposición entre pacientes asintomáticos en nuestra cohorte: 15.4%.
- Prevalencia de exposición de la población total de VIH: 17-17.5 %

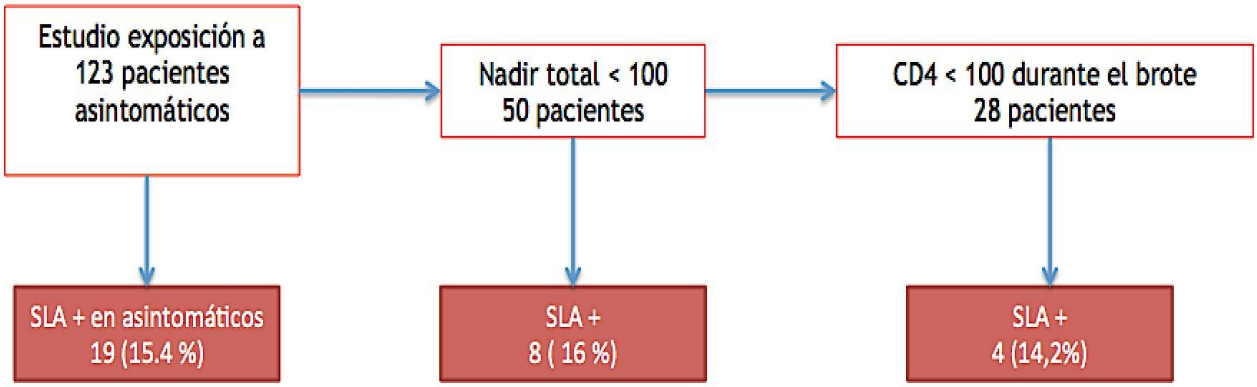
Por otro lado, en el grupo de pacientes asintomáticos expuestos se planteó la hipótesis de estimar el riesgo de padecer leishmaniasis visceral según las definiciones recogidas en material y métodos que clasifican a los pacientes expuestos asintomáticos en alto y bajo riesgo. Todos los pacientes asintomáticos expuestos cumplen con la definición de bajo riesgo de presentar enfermedad. Hay que destacar que todos ellos cumplen con esta definición al tener SLA positivo. En el tiempo de seguimiento ninguno de estos 19 pacientes ha presentado leishmaniasis visceral ni cutánea.

Por tanto, no se encontró ningún paciente asintomático que cumpliera con el perfil de alto riesgo de presentar enfermedad.

Del total de pacientes expuestos, solo 6 presentan SLA negativo y todos ellos habían tenido leishmaniasis antes de hacer el estudio. Cuatro son pacientes que se trataron de leishmaniasis visceral, pero están presentando de manera recurrente recaídas o que están en profilaxis, y los otros dos son los pacientes que han padecido leishmaniasis cutánea.

Debido a que el factor de riesgo más conocido para padecer leishmaniasis visceral entre los pacientes VIH es la cifra de $CD4^{+}$, siendo el riesgo mayor cuanto más bajo, se estudiaron los pacientes con exposición que habían tenido un nadir menor de 100 CD4 (Figura 21).

Figura 21. Porcentajes de SLA positivos en pacientes asintomáticos según su nadir y nivel de CD4+ durante el brote.



Como podemos ver, hay 50 pacientes asintomáticos que presentaron un nadir inferior a 100 $CD4^+$, de los cuales un 16% presenta SLA positivo; y 28 que presentaron niveles de $CD4^+$ inferiores a 100 durante el brote, de los cuales presentan SLA positivo un 14,2%.

Destacar que entre los 4 pacientes con CD4 < 100 y SLA positivo durante el brote, uno tuvo infección diseminada por MAI y otro una toxoplasmosis cerebral, pero no padecieron leishmaniasis a pesar de haber estado expuestos a Leishmania.

OBJETIVO 2. Estimación de la incidencia acumulada y tasa de incidencia de leishmaniasis visceral en la cohorte de pacientes VIH que viven en la zona de brote

La incidencia acumulada de leishmaniasis visceral en los pacientes VIH de nuestra cohorte desde el 1 de Enero de 2005 hasta el 31 de Diciembre de 2015 ha sido del 2.23% si tomamos como referente el número total de pacientes de nuestra cohorte (583), si bien es cierto, que si tomamos como muestra el total de pacientes VIH registrados por la Comunidad de Madrid en Fuenlabrada sería del 1.85% (13/704). Sin embargo, la incidencia no ha sido uniforme en este período ya que aumentó significativamente desde la declaración del brote. En nuestra cohorte, hubo 4 casos entre 430 pacientes seguidos hasta antes del brote (0.93%) y 9 casos sobre 462 seguidos después (1.94%).

Para el cálculo de el tasa de incidencia, y usando los datos de nuestra base de datos de la cohorte VIH, la suma de los períodos de riesgo de cada uno de los individuos enfermos durante todo el seguimiento fue 5.99 años. En este período hubo 13 casos de leishmaniasis visceral, lo que da una tasa de 2.17 leishmaniasis/año en la cohorte de 583 pacientes, o sea 372.2 casos por 100000 pacientes-año.

Considerando los períodos antes del brote (1 de Enero de 2005 al 31 de Mayo de 2009), con 4 pacientes de leishmaniasis visceral, y de 1 de Junio de 2009 a 31 de Diciembre de 2015, con 9 pacientes, tenemos para antes del brote un período de riesgo de 3.05 años por paciente, es decir 1.31 leishmaniasis/año en una cohorte de 430 pacientes; o sea 305.0 por 100000 pacientes-año. Después del brote obtuvimos 4.72 años de seguimiento, con 9 casos son 1.91 leishmaniasis/año para 462 pacientes, es decir 413.4 casos por 100000 pacientes-año.

OBJETIVO 3. Descripción del cuadro clínico y evolución de los pacientes que han desarrollado la enfermedad durante el estudio

Desde el 1 de enero de 2005 hasta el 31 de diciembre de 2015, 15 pacientes han presentado leishmaniasis en Fuenlabrada, 11 de ellos desde el inicio del brote el 1 de junio de 2009. Dos de los pacientes presentaron leishmaniasis cutánea (ambos durante el brote), y los otros 13 pacientes han presentado leishmaniasis visceral. Recientemente se ha diagnosticado en marzo de 2016 un caso más de leishmaniasis visceral (14 en total), en un paciente en el que han coincidido el diagnóstico de VIH con el de leishmaniasis visceral. Cabe destacar que este último caso evidencia que el brote sigue activo y que persiste la notificación de nuevos casos.

3.1. Leishmaniasis cutánea

Desde el inicio del brote, en el Hospital de Fuenlabrada, se han diagnosticado 357 casos de leishmaniasis cutánea. De todos estos casos, sólo 6 casos se han presentado en pacientes inmunodeprimidos, y de éstos, 4 han sido en pacientes con otro tipo de inmunosupresión (corticoides, metotrexate, anti-TNF) y sólo dos se han presentado en pacientes VIH.

En el caso del primer paciente, se trató de un paciente varón de 28 años, de nacionalidad española, que presentó una lesión en antebrazo izquierdo en enero de 2013, que llevaba seis meses de evolución. Como antecedente relevante, cabe destacar que su madre había presentado una leishmaniasis cutánea granulomatosa. La lesión consistía en un nódulo único, de 7 mm, eritemato-violáceo con una costra central. No presentaba lesiones a otros niveles. Se procedió a extirpar la lesión y se realizó un estudio anatomopatológico y PCR para leishmania. El estudio anatomopatológico mostró una dermatitis granulomatosa no

necrotizante, con PCR + para Leishmania. Con respecto a la evolución del VIH, el paciente fue diagnosticado en 2008 con 22 años, y la transmisión fue de origen homosexual. Se encontraba en categoría A2 sin que nunca se haya iniciado TARGA (aunque se le ha propuesto en varias ocasiones). En el momento del diagnóstico, presentaba 400 CD4+ cel/ µl. Tras la extirpación, el paciente presentaba una lesión cicatricial con bordes infiltrados, por lo que se realizó tratamiento con antimoniato de meglumina intralesional con 3 dosis, ya que posteriormente faltó a varias consultas, pero con resolución completa de las lesiones en posteriores consultas de seguimiento a las que sí acudió.

En el caso del segundo paciente, se trata de un varón de 58 años con VIH diagnosticado en 1992 (edad al diagnóstico de 34 años) en estadio C2 con 332 CD4+ cel/ µl y en tratamiento con TARGA con buena adherencia. El cuadro clínico consistió en una lesión en región malar con costra, de meses de evolución, que comenzó a estudiarse en octubre de 2010. Dicha lesión se analizó bajo sospecha de cáncer basocelular dados los antecedentes del paciente, entre los que destacaban varios carcinomas epidermoides (en región anorectal, trígono retromolar maxilar inferior) y linfoma no hodgkin de células grandes centroblásticas de cavum por el cual había recibido radioterapia en la zona de la lesión cutánea, en dos ocasiones. La biopsia mostró un infiltrado inflamatorio nodular, con granulomas no necrotizantes sin que se observaran leishmanias. Con la evolución de la lesión, ésta comenzó a impresionar de leishmaniasis cutánea, por lo que se solicitó PCR para leishmania en la muestra anatomopatológica, que resultó positiva. Se realizó tratamiento intralesional con antimoniato de meglumina intralesional, y tras dos dosis, el paciente presentó muy buena evolución, con desaparición de la lesión infiltrada y persistencia únicamente de una mácula residual.

Por lo tanto, en resumen, ambos pacientes fueron diagnosticados ante la sospecha

clínica por el aspecto de las lesiones de leishmaniasis cutánea, y tras la realización de PCR para leishamania sobre la muestra anatomopatológica de la biopsia. En ninguna de las muestras se vieron leishmanias, pero sí infiltrado linfohistocitario dérmico difuso con granulomas epitelioides no necrotizantes.

Ninguno de los pacientes desarrolló clínica sistémica (no astenia, fiebre, pérdida de peso…) ni alteraciones analíticas como pancitopenia, aumento de ferrtitina, etc… y ninguno presentó adenopatías palpables regionales. Todos presentaron excelente evolución con tratamiento intralesional, y ambos presentaron lesiones cutáneas únicas.

Con respecto al VIH ambos pacientes presentaban niveles de CD4+ > 200 cel/ µl, con carga viral controlada, y sólo uno de ellos estaba en tratamiento antirretroviral.

3.2. Leishmaniasis visceral

Durante el periodo del estudio, 13 pacientes han desarrollado leishmaniasis visceral. En el mes de marzo 2016 se diagnosticó un nuevo caso que aún se encuentra en tratamiento. De los 13 casos, dos fallecieron, uno debido a complicaciones derivadas de una cirrosis y el otro paciente debido a una leucoencefalopatía multifocal progresiva y un tercero no acudió a las consultas de seguimiento que tenía programadas, por lo que solo se pudo realizar el seguimiento a largo plazo de 10 pacientes.

A continuación desarrollaremos las características generales de los pacientes y del cuadro clínico que presentaron.

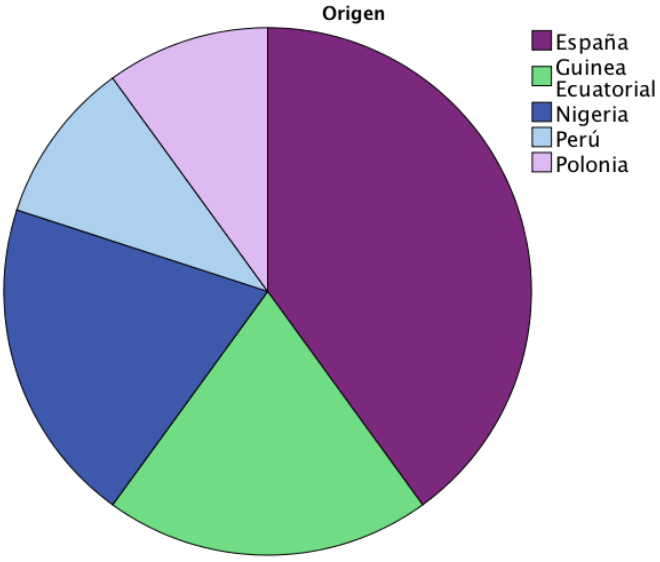
3.2.1 Características epidemiológicas

La características epidemiológicas de nuestra muestra están resumidas en la tabla 6. Los pacientes tenían una edad media de 43 + 10,6 años en el momento de contraer la enfermedad, con un rango que comprendía desde los 18 a los 54 años. El ratio hombre/mujer

fue de 4:1. Un 60% eran inmigrantes y un 40% de raza negra, descendientes de africanos, con una distribución donde hay un ligero predominio de pacientes de esta ascendencia.

Se puede observar la distribución por países en el gráfico siguiente (figura 22). Llama la atención que los pacientes llevaban en España una media de 15 años, sin que hubiera ningún caso de inmigrantes que llegaron en los últimos 5 años, lo que induce a pensar que ninguno de los casos fue importado, y que los pacientes se infectaron todos en España.

Figura 22. Distribución por países de la pacientes con leishmaniasis visceral.



En cuanto a los factores de riesgo para la adquisición del VIH, en 6 de los pacientes fue por trasmisión heterosexual, 4 por UDVP (usuarios drogas por vía parenteral) , 2 HSH (Hombres que tienen sexo con hombres) y una paciente por transmisión vertical.

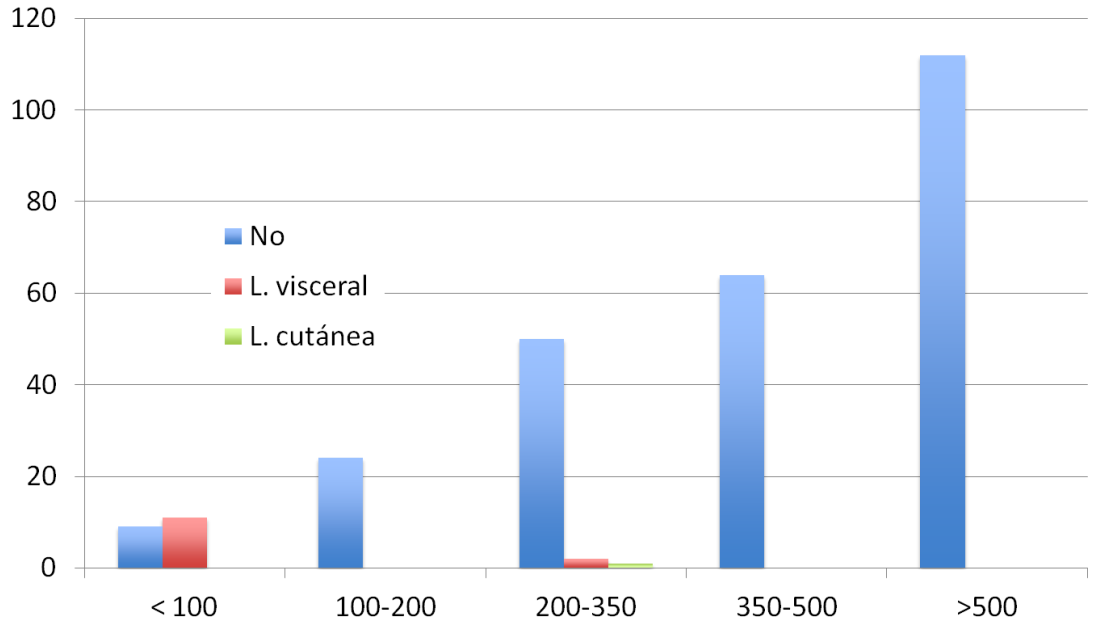
Tabla 6. Características epidemiológicas de los 14 pacientes VIH con leishmaniasis visceral.

	Sexo	Edad	HIV FR [a]	Origen	Niveles CD4 (cells/µl)	TARGA [b]	Tratamiento(mg/Kg)	Profilaxis Secundaria
Paciente 1	Varón	44	UDVP	España	99	No	Anfotericina B liposomal (30)	Antimoniales
Paciente 2	Varón	33	Hetero	Nigeria	4	No	Anfotericina B liposomal (32)	Anfotericina B liposomal
Paciente 3	Varón	34	Hetero	Perú	29	No	Anfotericina B liposomal (30)	Anfotericina B liposomal
Paciente 4	Mujer	41	Hetero	Guinea Ecuatorial	305	TDF/FTC/EFV	Anfotericina B liposomal (40)	Anfotericina B liposomal
Paciente 5	Varón	46	Hetero	España	46	No	Anfotericina B liposomal (22)	Antimoniales
Paciente 6	Varón	33	Hetero	Nigeria	322	No	Anfotericina B liposomal (40)	Anfotericina B liposomal
Paciente 7	Mujer	18	Vertical	Guinea Ecuatorial	16	No	Anfotericina B liposomal (21)	Anfotericina B liposomal
Paciente 8	Varón	54	MSM	España	104	TDF/FTC+ LPVr	Anfotericina B liposomal (39)	Anfotericina B liposomal
Paciente 9	Varón	44	UDVP	España	46	No	Anfotericina B liposomal (31)	Antimoniales
Paciente 10	Varón	37	MSM	Polonia	48	No	Anfotericina B liposomal (31)	Anfotericina B liposomal
Paciente 11	Varón	64	Hetero	Guinea Ecuatorial	46	ABC/3TC/EFV	NO	NO
Paciente 12	Varón	35	UDVP	España	4	NO	Anfotericina B liposomal (40)	NO
Paciente 13	Varón	47	UDVP	España	82	TDF/FTC/EFV	Anfotericina B liposomal 40)	Anfotericina B liposomal
Paciente 14	Varón	32	Hetero	Rumania	43	-	Anfotericina B liposmal (40)	-

En cuanto a la situación del VIH en dichos pacientes, podemos ver que estaban en tratamiento sólo 4 de los 13 pacientes, y que solo dos pacientes presentaban más de 200 CD4+ cells/µl. Un 70% presentaron menos de 100 CD4+ cells/µl durante el brote.

Como puede verse en la figura siguiente (Figura 24), la mayoría de los pacientes que desarrollaron leishmaniasis visceral presentaba niveles bajos de CD4+, no así los pacientes con leishmaniasis cutánea. Los dos pacientes con leishmaniasis y más de 200 CD4+ son ambos de raza negra, esto cierto interés como se explicará en el apartado de discusión.

Figura 24. Pacientes VIH en seguimiento regular (318) distribuidos por niveles de $CD4^{+}$ y los casos de presentaciones clínicas de leishmaniasis (LV y LC).

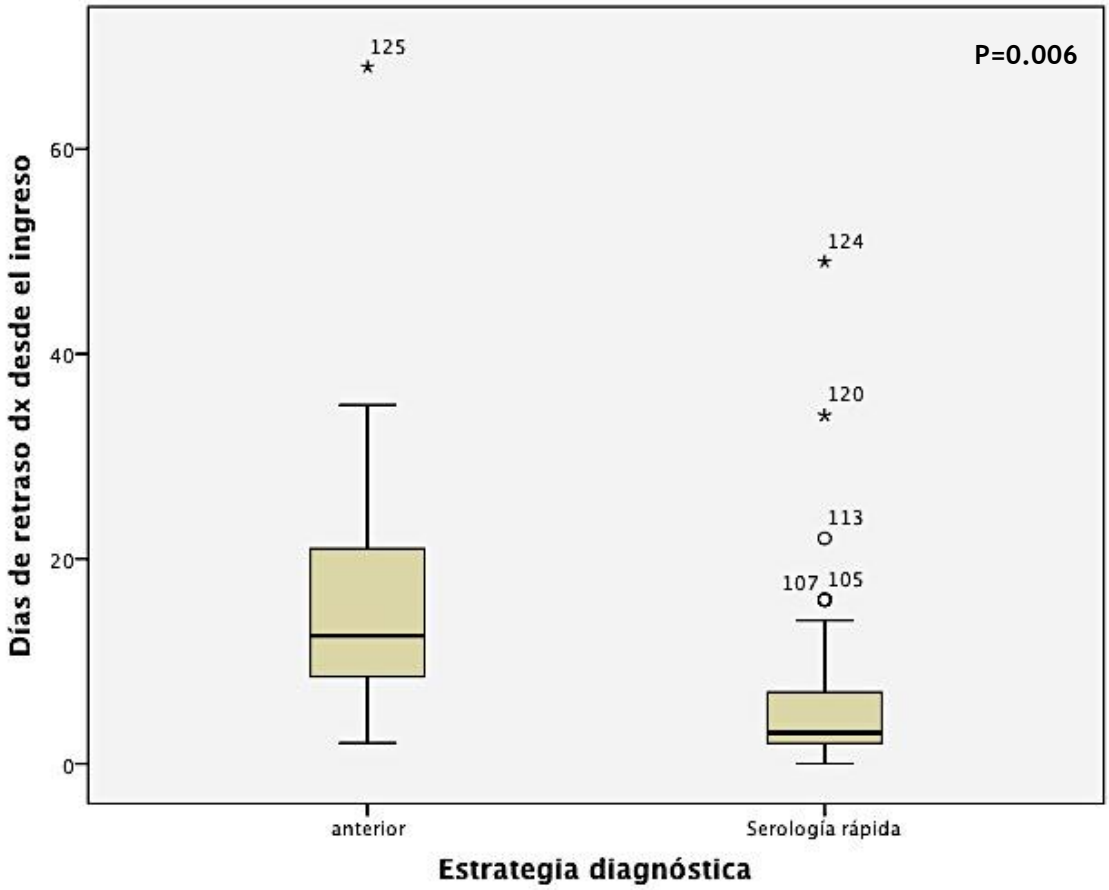


3.2.2 Clínica

El cuadro clínico presentado por nuestros pacientes no presentó grandes diferencias con respecto al cuadro presentado en pacientes inmunocompetentes. A nivel clínico predominó la presentación de un cuadro de astenia, anorexia y pérdida de peso. Como puede observarse en la tabla 7 que resume los datos clínicos principales presentados por los pacientes VIH, un 64% presentó fiebre, lo que supone un menor porcentaje que en pacientes inmunocompetentes, un 35% presentó astenia, un 28% anorexia y un 35% pérdida de peso. Existió un amplio porcentaje de pacientes con esplenomegalia (78%) si bien, de esta esplenomegalia que se diagnosticó radiológicamente, a nivel clínico sólo se pudo objetivar con la exploración física en 6 pacientes (42%).

Entre nuestros pacientes, la mediana de días de diagnóstico fue de 21 días (media de 78 + 36). Con respecto al retraso en el diagnóstico, conforme avanzó el brote, se fueron acortando los tiempos de diagnóstico. Como se puede ver en la figura siguiente (figura 24), con los datos que disponemos del brote global con inmunocompetentes incluidos, antes del brote, cuando no disponíamos de la serología rápida, la mediana de retraso del inicio del tratamiento desde el ingreso era 12.5 días, y posteriormente, el tratamiento se retrasaba sólo 3 días.

Figura 24. Mediana de los días de retraso desde el inicio del brote según la estrategia diagnóstico (ELISA/IFI) vs serología rápida.



Cabe destacar el caso de tres pacientes que han presentado varias recidivas, que muestran como el tratamiento y el mantenimiento de la profilaxis secundaria es muy complicada en determinadas situaciones.

El primero se trató de un paciente diagnosticado por biopsia hepática en el contexto de estudio de hipertransaminemia, que es diagnosticado en mayo de 2012, realizando tratamiento con anfotericina B a dosis de 30 mg/kg en 10 dosis, manteniendo profilaxis

mensual a la misma dosis. Tras el tratamiento normalizó transaminasas hepáticas. Se mantuvo una PCR en sangre para leishmania positiva o cultivo positivo durante al menos 5 extracciones durante el año 2014, y 2015, presentando de manera persistente una respuesta linfoproliferativa frente a SLA negativa en todas las extracciones. Siempre con CD4 entre 111 y 150 cel/µl y carga viral indetectable. El paciente se mantuvo con profilaxis mensual con anfotericina B liposomal y en ningún momento ha presentado ninguna sintomatología que sugiriera recidiva (fiebre, astenia, pancitopenia…).

El segundo caso se trata de un paciente de origen nigeriano, diagnosticado en 2012 de leishmaniasis visceral por visualización de amastigotes en aspirado de médula ósea. Fue tratado con Anfotericina B Liposomal a dosis de 4 mg/kg/d, en total 8 días al no acudir posteriormente a las dos últimas dosis previstas (recibió un dosis de total 32 mg/kg). Posteriormente recibió dos dosis de profilaxis y posteriormente 6 meses después sufrió una recaída que fue retratada con Anfotericina B liposomal, 40mg/Kg, cumpliendo adecuadamente con el tratamiento.

En ese momento el paciente abandona las dos últimas dosis y abandona el TARGA y no vuelve al hospital, perdiéndose el seguimiento, volviendo seis meses más tarde con síntomas y PCR Leishmania en sangre positiva. Se inicia de nuevo tratamiento con dosis de Anfotericina B liposomal de 20mg/kg en dos dosis y mantiene la profilaxis adecuadamente hasta seis meses después que de nuevo deja todo el tratamiento.

El paciente ha mantenido un VIH con mal control con $CD4^+$ menores de 100 cel/µl en todo momento. Cinco meses después vuelve para retomar el tratamiento, con una CV de 220000 c/mL (5.3 log) y 14 $CD4^+$, sin clínica sugerente de recaída de leishmaniasis visceral (pero con PCR en sangre positiva para leishmania), realizando de manera correcta la profilaxis desde entonces, pero manteniendo unos niveles de $CD4^+$ muy bajos en todo

momento. Este paciente también ha presentado en todo momento respuesta linfoproliferativa frente a SLA negativa.

El tercer paciente ha presentado una leishmaniasis visceral recidivante con 6 episodios hasta ahora. El primer episodio fue en marzo de 2012, cuando previamente había abandonado el tratamiento antiretroviral y presentaba una carga viral de 348063 y 40 $CD4^+$. Se realiza tratamiento con anfotericina B liposomal 30 mg/ kg/ día y con profilaxis mensual posterior con la misma dosis. Entre este episodio y el siguiente, el paciente presenta un cambio de tratamiento antiretroviral por fracaso virológico, manteniendo la profilaxis secundaria para leishmaniasis visceral.

A los 8 meses, presenta un segundo episodio de leishmaniasis visceral realizándose un nuevo tratamiento con anfotericina B liposomal a dosis de 40 mg/kg y profilaxis secundaria a la misma dosis.

Cuatro meses después vuelve a presentar un tercer episodio de leishmaniasis visceral (en todos los casos el paciente se encuentra sintomático y se confirma el diagnóstico con aspirado de médula o PCR). En este tercer episodio, se intenta tratamiento con miltefosina que el paciente no tolera por vómitos y diarrea intensa, tomándola sólo 10 días y se continua con la misma dosis cada 3 semanas. El paciente presenta PCR positiva para leishmania en sangre, y respuesta celular frente a SLA reiteradamente negativa.

El cuarto episodio fue siete meses después y es tratado esta vez con glucantime intramuscular diario durante 4 semanas con su mantenimiento como profilaxis secundaria cada dos semanas. Siete meses más tarde presenta el 5º episodio donde se realiza un tratamiento combinado con glucantime y paramomicina que no tolera (las inyecciones de paramomicina resultan muy dolorosas) y sólo recibe este tratamiento una semana planificándose un nuevo ciclo de anfotericina B liposomasl de 40 mg/kg con profilaxis

secundaria, esta vez cada 2 semanas.

Persiste PCR positiva para leishmania en sangre y respuesta celular linfoproliferativa frente a SLA negativa. Seis meses más tarde presenta el ultimo episodio de leishmaniasis en noviembre de 2014 que cursa con febrícula y una adenopatía retroauricular. Se realiza un nuevo ciclo de anfotericina B liposomal y profilaxis quincenal que alterna con profilaxis con glucantime de manera alterna desde entonces. Permanece con PCR positiva en sangre para leishmania pasándose en febrero de 2015 a profilaxis combinada con anfotericina B liposomal y fluconazol, que es con lo que continúa desde entonces.

Tabla 7. Resumen de la clínica de leishmaniasis visceral y presencia de esplenomegalia.

	Tiempo hasta el diagnóstico en días	FIEBRE	ASTENIA	ANOREXIA	PERDIDA DE PESO	ESPLENOMEGALIA EXPL.FÍSICA	ESPLENOMEGALIA RADIOLÓGICA (cm)
Paciente 1	120	No	No	No	No	Si	Si
Paciente 2	90	SI	No	No	Pérdida de peso	No	Si (16,8 cm)
Paciente 3	12	SI	No	No	No	No	Si (19,0 cm)
Paciente 4	425	No	No	No	No	No	Si (14,7 cm)
Paciente 5	16	No	Astenia	No	No	Si	Si (18,0 cm)
Paciente 6	10	SI	No	No	No	No	Si (14,0 cm)
Paciente 7	21	SI	No	No	No	Si	Si (19 cm)
Paciente 8	16	SI	No	Anorexia	No	Si	No (12,5 cm)
Paciente 9	22	No	Astenia	No	No	No	Si (14,0 cm)
Paciente 10	45	SI	No	No	No	No	No
Paciente 11	240	No	Astenia	Anorexia	Pérdida de peso	No	No
Paciente 12	27	SI	No	No	Pérdida de peso	Si	Si
Paciente 13	20	SI	Astenia	Anorexia	Pérdida de peso	Si	Si (16,0)
Paciente 14	27	SI	Astenia	Anorexia	Pérdida de peso	No	Si (16 cm)

3.2.3 Parámetros analíticos

En la siguiente tabla podemos ver el resumen de los hallazgos analíticos. Cabe destacar que determinados parámetros como la ferritina y la velocidad de sedimentación se recogieron en pocos pacientes, pero con resultados muy consecuentes, estando alterados en la mayoría de los pacientes. Hay que destacar los resultados de la ferritina por sus niveles excepcionalmente elevados (sobre la que se amplía la información en la discusión y más adelante en la comparación de inmunosuprimidos vs inmunocompetentes).

Tabla 8. Características analíticas de los pacientes VIH en la analítica de ingreso.

Parámetros analíticos	% DE	MEDIA (± SD)
Anemia	78 %	10,4 gr/dl (±1,6)
Leucopenia	85 %	2,435 10^3 /µ (± 1335)
Trombopenia	92 %	105, 928 10^3 /µ (± 42, 683)
PCR > 20mg/l	58 %	6,5 mg/DL(±6,8)
VSG > 30 mm	100%	76 mm/h (±30)
Ferritina > 300 ng/mL	83%	520 ng/mL(± 1550)
LDH > 248 U/L	46 %	270 L(± 143)

3.2.4 Pruebas diagnósticas

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico de estos pacientes han sido el test rápido de dipstick rK39, test de Elisa o IFAT (inmunofluorescencia indirecta), PCR en sangre, PCR en aspirado de médula ósea y visualización directa de Leishmania en aspirado de médula ósea. Los resultados de las muestras diagnósticas realizadas se muestran la siguiente tabla:

Tabla 9. Pruebas diagnósticas realizadas:

	% positivos (total de pacientes con test realizado)
Visualización directa en aspirado m. ósea	46% (13)
Cultivo m. ósea	100% (4)
PCR m. ósea	81% (11)
PCR sangre	100% (3)
rk39	56% (9)
IFI/ELISA	100% (13)

Respecto a las técnicas serológicas, cabe destacar que en todos los pacientes VIH con rK39 positivo se confirmó la presencia de leishmanias por otras técnicas, lo que se interpretaría como un valor predictivo positivo del 100%, mientras que en un paciente de nuestra cohorte VIH con clínica compatible y ELISA positivo no se confirmó leishmaniasis visceral, siendo el valor predictivo positivo estimado del ELISA del 93%.

Por otro lado, a 3 pacientes se les realizó IFAT y a los otros 10 ELISA, lo que se debió al cambio en la técnica de nuestro laboratorio.

3.2.5 Tratamiento recibido y profilaxis realizada

Todos los pacientes, menos uno, recibieron tratamiento con anfotericina B liposomal como viene expuesto en la tabla 10. La media de tratamiento fueron unos 41, 4 mg/kg, una dosis ligeramente más alta que los pacientes inmunocompetentes que recibieron tratamiento con dosis entre 15-30 mg/kg.

Tabla 10. Tratamiento y profilaxis recibidas.

	Tratamiento (mg/Kg)	Profilaxis Secundaria
Paciente 1	Anfotericina B liposomal (30 mg/Kg)	Antimoniales
Paciente 2	Anfotericina B liposomal (32 mg/Kg)	Anfotericina B liposomal
Paciente 3	Anfotericina B liposomal (30 mg/Kg)	Anfotericina B liposomal
Paciente 4	Anfotericina B liposomal (40 mg/Kg)	Anfotericina B liposomal
Paciente 5	Anfotericina B liposomal (22 mg/Kg)	Antimoniales
Paciente 6	Anfotericina B liposomal (40 mg/Kg)	Anfotericina B liposomal
Paciente 7	Anfotericina B liposomal (21 mg/Kg)	Anfotericina B liposomal
Paciente 8	Anfotericina B liposomal (39 mg/Kg)	Anfotericina B liposomal
Paciente 9	Anfotericina B liposomal (31 mg/Kg)	Antimoniales
Paciente 10	Anfotericina B liposomal (31 mg/Kg)	Anfotericina B liposomal
Paciente 11	NO	NO
Paciente 12	Anfotericina B liposomal (40 mg/Kg)	NO
Paciente 13	Anfotericina B liposomal (40 mg/Kg)	Anfotericina B liposomal
Paciente 14	Anfotericina B liposomal (40 mg/Kg)	-

La profilaxis se ha realizado mayoritariamente con anfotericina B, salvo en tres

pacientes en los que se ha realizado con antimoniales debido principalmente a efectos secundarios de la anfotericina B liposomal, de la que hablaremos más adelante.

En 4 pacientes se consideró que la profilaxis había fracasado, ya que presentaron recidivas, pero de estos 4, dos fueron porque abandonaron la profilaxis, y todos se retrataron con anfotericina B liposomal. La media de tiempo hasta el fracaso/ recidiva fue de 103 días, con un rango de entre 30-227 días y con dosis de 40 mg/kg en dos de los pacientes, y los otros dos, uno con 30 mg/kg y el otros 21 mg/kg.

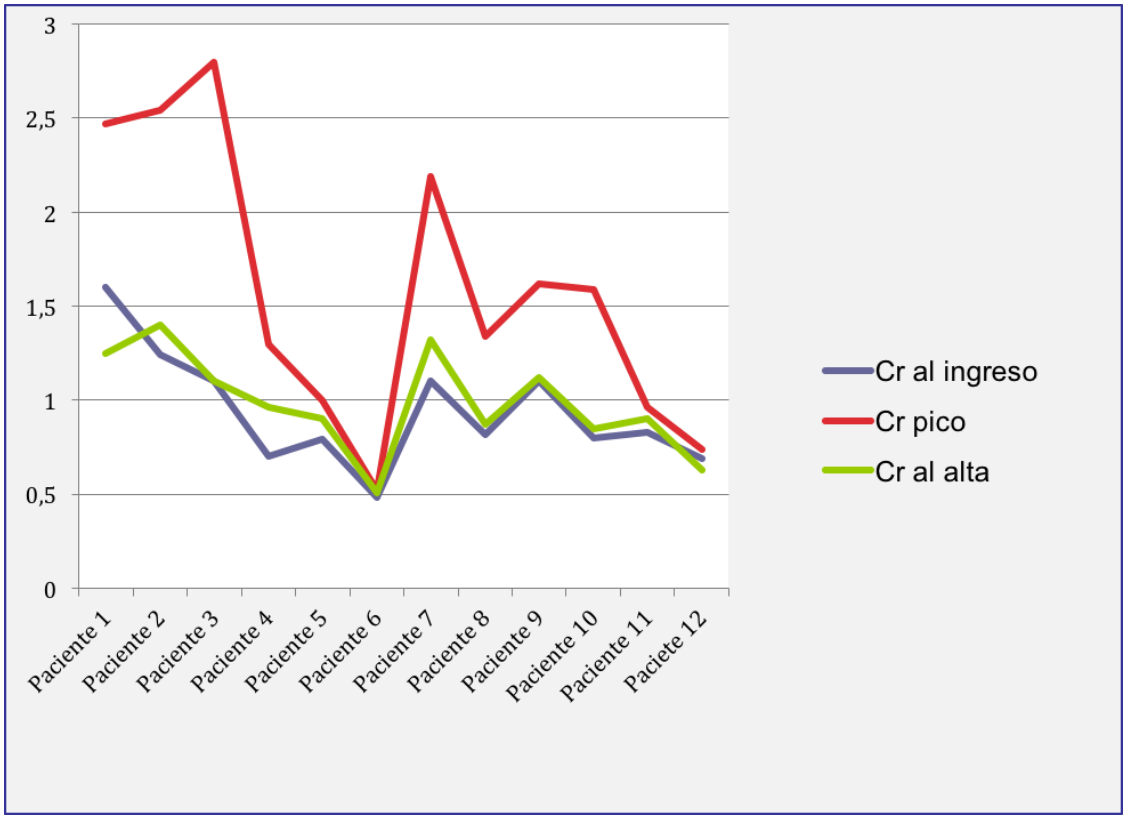
Con respecto a los efectos secundarios, el 50% desarrolló cierto grado de insuficiencia renal que normalmente no precisaba la retirada del tratamiento. Solo en un paciente fue necesario cambiar de tratamiento, y además, este paciente presentó una reacción alérgica grave durante la administración de anfotericina B liposomal.

En la mayoría de las situaciones, se podía aplazar la administración de la dosis 24-48 horas mientras se hidrataba al paciente con suero salino intravenosos, y todos los paciente presentaron buena evolución con creatininas al alta parecidas a las iniciales.

Uno de los pacientes (paciente 10) presentó durante el ingreso un fracaso renal agudo con proteinuria en rango no nefrótico y hematuria con crioglobulinas tipo III (IgG positivas), y posteriormente fue diagnosticado de una glomerulonefritis membranoproliferativa en relación con crioglobulinemia tipo II. Como se puede ver en la figura 24 no fue de los pacientes que más elevó la creatitinina, y tras la suspensión del tratamiento con anfotericina B liposomal el paciente normalizó función renal y a partir de entonces se realizó profilaxis con Glucantime, media ampolla itramuscular.

Como se puede ver en el siguiente gráfico todos los pacientes mostraron un aumento de la creatinina, volviendo a la suya basal tras concluir el tratamiento.

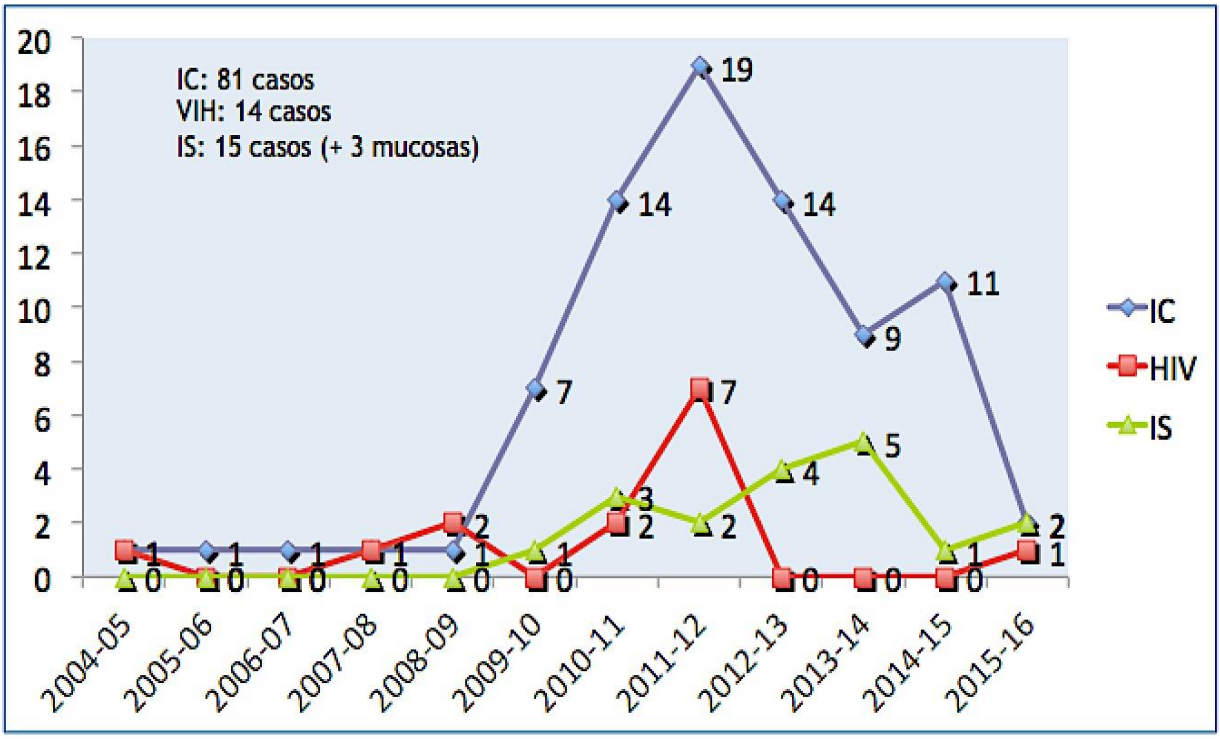
Figura 24. Muestra los niveles de creatinina en mg/dl al ingreso, en su punto máximo y al alta.



OBJETIVO 4. Comparativa de cuadro clínico, pruebas diagnósticas e inmunológicas entre pacientes inmunocompetentes, VIH y en tratamiento inmunosupresor

Desde la apertura del hospital de Fuenlabrada, hemos diagnosticado 110 casos de leishmaniasis visceral, de los cuales 81 fueron en pacientes inmunocompetentes, 14 en pacientes VIH y 15 en pacientes que estaban en tratamiento con fármacos inmunosupresores.

Figura 25. Distribución de casos de Leishmaniasis visceral, excluyendo la ganglionar.



En el gráfico anterior, se puede ver la distribución de la aparición de los casos por años de cada subgrupo; IC (inmunocompetentes), VIH e IS (pacientes en tratamiento con fármacos inmunosupresores). Se puede observar que los casos en inmunocompetentes así como en pacientes VIH tienen un claro pico de incidencia en 2011/2012, mientras que los

casos en pacientes que están en tratamiento inmunosupresor se ha mantenido más o menos igual con entre 2 y 5 casos al año.

4.1 Características epidemiológicas

Las características epidemiológicas de la población de inmunocompetentes y pacientes que están en tratamiento con fármacos inmunosupresores es parecida, pero existen algunas diferencias. Realizados los análisis estadísticos, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en sexo. Así pues, podemos ver que las poblaciones son poblaciones jóvenes, con ligero predominio de sexo masculino afecto. En la población de pacientes en tratamiento inmunosupresor hay una población ligeramente más mayor, con una media de edad de 56 años frente a los otros dos grupos con medias de 43 y 42 años, y esta diferencia es estadísticamente significativa (ANOVA, p=0.01). También resulta llamativa la proporción de pacientes de raza negra entre los pacientes inmunocompetentes. Hay un 49,4% de pacientes negros, versus 38,5% en el grupo de VIH y un 13,3% en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor y la diferencia es estadísticamente significativa (p=0.02).

4.2 Clínica

En cuanto a la clínica presentada dentro de los diferentes grupos, se puede observar en la tabla 11, que los síntomas presentados son más o menos parecidos, con una diferencia en la presentación de la fiebre, con un menor porcentaje de pacientes que presentan fiebre en el grupo de pacientes VIH, solo un 64% de los pacientes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p=0.001). La presencia de dolor torácico es más frecuente en pacientes VIH (un 23% vs 4% y 7%), sin llegar a ser estadísticamente significativo, pero mostrando cierta tendencia (p=0.057).

Con respecto al resto de los síntomas, los signos clásicos asociados a la

leishmaniasis visceral son los experimentados con más frecuencia; fiebre, astenia y pérdida de peso, pero cabe señalar, que no aparecen en más de la mitad de los pacientes.

Existen síntomas más raros, que no están descritos de manera habitual en la literatura, que sin embargo sí han presentado durante el brote una proporción no desdeñable de pacientes, como por ejemplo la tos (30%), la cefalea (20-30%), etc…

Tabla 11. Comparativa de los síntomas de leishmaniasis visceral entre los diferentes grupos.

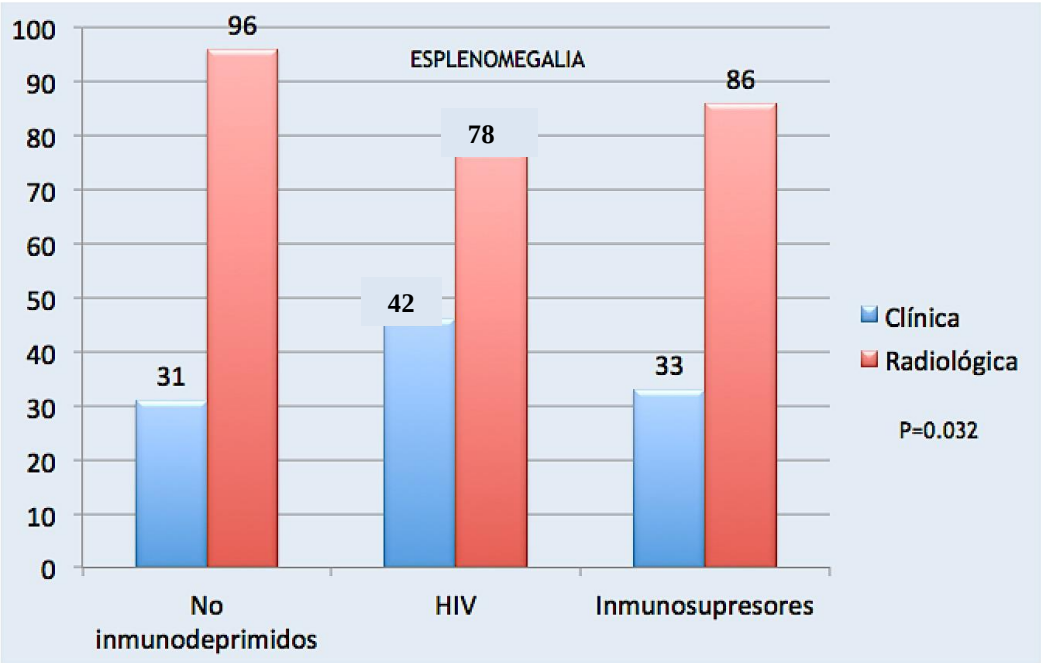
	IC (n=81)	HIV (n=14)	Tto IS (n=15)	P
Duración de síntomas antes tto (días)	32	26	32	0.891
Fiebre (n,%)	98	64	93	0.001
Astenia (n,%)	45	35	67	0.15
Pérdida peso (n,%)	40	35	33	0.741
Tos (n,%)	31	29	23	0.205
Cefalea (n,%)	35	8	20	0.085
Náuseas/vómitos (n,%)	25	23	0	0.081
Anorexia (n,%)	29	28	20	0.712
Dolor abdominal (n,%)	15	8	7	0.695
Odinofagia (n,%)	7	8	7	0.994
Disnea (n,%)	7	15	0	0.29
Dolor torácico (n,%)	4	23	7	0.057
Rinorrea (n,%)	4	0	13	0.18
Lumbalgia (n,%)	5	0	7	0.67
Diarrea (n,%)	6	7	13	0.601
Disuria (n,%)	2	15	0	0.111

4.3 Signos y exploración

Con respecto a los signos y la exploración, existen unos porcentajes muy altos de esplenomegalia cuando se realiza la exploración radiológicamente, si bien, es mucho más baja su detección mediante la exploración física convencional.

Podemos ver los porcentajes en el siguiente gráfico, pudiendo ver que mediante la exploración radiológica, la detección de esplenomegalia es muy alta, con porcentajes entre 78-96%, viendo que en pacientes VIH, la detección es más baja, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p=0.032). Mediante la exploración convencional, la detección de esplenomegalia es baja (30-42%).

Figura 26. Muestra las diferencias en porcentaje, de presencia de esplenomegalia entre los diferentes grupos de comparación mediante exploración física y radiológica.



En cuanto a los resultados analíticos, entre los tres grupos, no existen grandes diferencias en los porcentajes de pacientes que presentaban pancitopenia, encontrándose en

porcentajes muy elevados, una disminución de las tres series hematológicas.

En el grupo de pacientes que están con tratamiento inmunosupresor, el 100% presentó hemoglobina menor de 12gr/dl, menos de 4.000 10^3 /µl leucocitos y plaquetas menores de 150,000 10^3 /µl. Además este grupo de pacientes presentaron una media de hemoglobina menor en relación a otros grupos (ANOVA p=0.014) con una media de 8,9 gr/dl frente a una media en los otros dos grupos de 10 gr/dl y también una menor media de plaquetas (69333 10^3 /µl) frente a 850,000 10^3 /µ y 115,00010 ^{3} /µ siendo también estadísticamente significativa esta diferencia (p= 0.009).

Tabla 12. Comparativa de los hallazgos analíticos de los pacientes con leishmaniasis visceral entre los diferentes grupos.

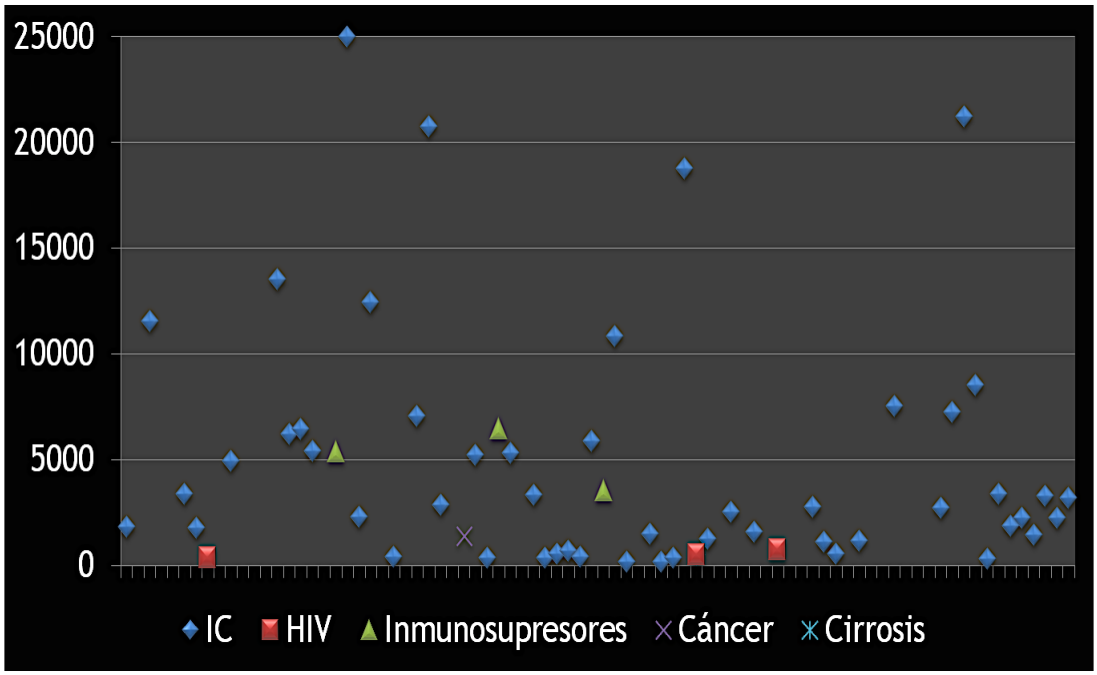
L. VISCERAL	IC=81	HIV=14	IS=15	p
Hb <12 gr/dl	88%	78%	100%	0.176
Leucocitos <4000 10^3 /µl.	89%	85%	100%	0.338
Plaquetas < 150000 10^3 /µl.	93%	92%	100%	0.553
PCR > 20 mg/l	96%	58%	79%	<0.001
VSE > 60 mm	71%	62%	40%	0.161
Ferritina > 1000 ng/mL	76%	17%	77%	0.001

Cabe destacar también, que hay tres parámetros, con marcadas diferencias, que son estadísticamente significativas. Se observa que en pacientes VIH, los reactantes de fase aguda no se elevan como en el resto de los grupos. Un caso especialmente evidente es la

elevación de la ferritina.

Así pues, como se puede observar en la tabla, un 76% de los pacientes inmunocompetentes y en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor presentaban niveles por encima de 1000 ng/mL (rango de normalidad: 12-300 ng/mL en hombres y 12-150 ng/mL en mujeres) mientras que sólo un paciente presentó niveles tan elevados. En la siguiente figura, podemos ver los valores de ferritina de las distintas muestras.

Figura 27. Muestra los niveles de ferritina en las diferentes muestras, entre los diferentes grupos.



Es muy evidente el nivel alto de ferritina en pacientes inmunocompetentes que en ocasiones llega hasta valores muy elevados de hasta 25,000 ng/mL, y también su elevación en pacientes en tratamiento inmunosupresor con valores medios de 5948 ng/mL. Esto contrasta enormemente con los pacientes VIH en los que se ven valores muy bajos, con una media de 454,4 ng/mL rozando los niveles de normalidad salvo en un paciente aislado

que presentó una ferritina de 4224 ng/mL, si bien es cierto que este paciente presentaba complicaciones de una cirrosis, que podrían justificar estos valores. Estas diferencias mediante el análisis ANOVA fueron estadísticamente significativas (p= 0.001).

Con respecto a la proteína C reactiva, los resultados son parecidos a aquellos de la ferritina, pero con menores diferencias. En los grupos de inmunocompetentes y pacientes bajo tratamiento inmunosupresor, hay una mayoría de pacientes (96% y 79% respectivamente) con PCR > 20 mg/l, mientras que esto solo es así en un 58% de los pacientes VIH (p <0.001).

Por último, como podemos ver en la tabla 12, con respecto a los resultados de la velocidad de sedimentación, las diferencias encontradas no son tan claras, y no son significativas estadísticamente.

4.4 Comparativa de las pruebas diagnósticas e inmunológicas:

Con respecto a las diferentes técnicas diagnósticas que se han realizado a los diferentes grupos de enfermos, los resultados se encuentran resumidos en la tabla 13.

Se puede observar que la visualización de parásitos en la médula tiene una baja sensibilidad, que llega escasamente al 50% de los pacientes, presentando valores similares entre los diferentes grupos.

Llama la atención que el cultivo en los pacientes con VIH fue siempre positivo en todos en los que se realizó, y sorprendentemente muy bajo en los pacientes inmunocompetentes, y algo más elevada en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor (60%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

La realización de PCR tanto en sangre como médula ósea tienen sensibilidades bastante altas, que oscilan entre 80 y 100% en el caso de la realizada en la médula ósea y

un 64-80% en la realizada en sangre periférica.

En cuanto a las distintas técnicas serológicas realizadas, se observa que el test rápido rK39 con dipstick presenta una baja sensibilidad en todos los grupos, con una sensibilidad media que no llega al 50%, si bien es cierto que presenta un buen valor predictivo positivo (97%).

En cuanto al ELISA, a lo largo del estudio registramos 13 pacientes en total con sospecha clínica de leishmaniasis visceral y ELISA positivo en los que no se confirmó el diagnóstico (incluido un paciente VIH), considerándose como falso positivo, lo que permitiría estimar de forma global un 89% de especificidad para esta prueba.

Tabla 13. Comparativa de la sensibilidad de la diferentes técnicas diagnósticas entre los diferentes grupos.

SENSIBILIDAD	IC (%,n)	HIV(%,n)	IS(%,n)	Total(%,n)	p
Microscopía	41% (74)	46% (13)	53% (15)	42% (102)	0.666
Cultivo m. ósea	19% (23)	100% (4)	60% (5)	38% (32)	0.027
PCR m. ósea	93% (67)	81% (11)	100% (15)	92% (85)	0.138
PCR sangre	64% (14)	100% (3)	80% (5)	70% (20)	0.434
Serología (rK39)	44% (54)	56% (9)	64% (11)	49% (74)	0.747
IFI/ ELISA	96% (79)	100% (13)	100% (15)	97% (104)	0.634

4.5 Comparativa de la respuesta linfoproliferativa con SLA (Soluble Leishmania Antigen) entre los diferentes grupos de pacientes según situación inmunológica:

Una de las pruebas inmunológicas que se ha realizado en los tres grupos de pacientes es la medición de la respuesta linfoproliferativa frente a antígeno soluble de leishmania, con el objetivo de observar si existen diferencias que pudieran esclarecer la respuesta inmunológica frente al parásito.

Como se muestra en la tabla 14 y en la figura 28, se pueden observar que los niveles medios entre los grupos son diferentes, antes del tratamiento, con una media más baja en pacientes VIH que concuerda con el hecho de que estos pacientes presentan niveles más bajos de estimulación linfocitaria debido a su tipo de inmunosupresión (p=0.08).

Tabla 14. Muestra las medias de índice de estimulación SLA ANTES del tratamiento.

	Media (intervalo confianza 95%)
Inmunocompetente	1,5 (1,17 - 1,8)
VIH	0,97 (0,8 - 1,1)
Ttº Inmunosupresor	2,3 (0,5 - 4,0)

En la tabla 15 y en la figura 29 se muestran las diferencias de los índices de estimulación tras el tratamiento, considerándose los pacientes curados. Se puede observar que todos los índices de estimulación están aumentados con respecto a la situación previa al tratamiento, cuando los pacientes estaban enfermos.

Llama la atención el aumento muy importante del índice de estimulación frente a SLA en pacientes VIH cuya media está por encima de la de los otros dos grupos, con unas diferencias, que si bien no son significativas estadísticamente, muestran una tendencia.

Tabla 15. Muestra las medias de índice de estimulación SLA TRAS el tratamiento.

	Media (intervalo confianza 95%)
Inmunocompetente	4,7 (3,9 – 5,6)
VIH	7,0 (4,5- 9,5)
Ttº Inmunosupresor	4,8 (3,7 – 5,8)

Figura 28. Diferencias en el índice de estimulación SLA entre los diferentes grupos antes de tratamiento.

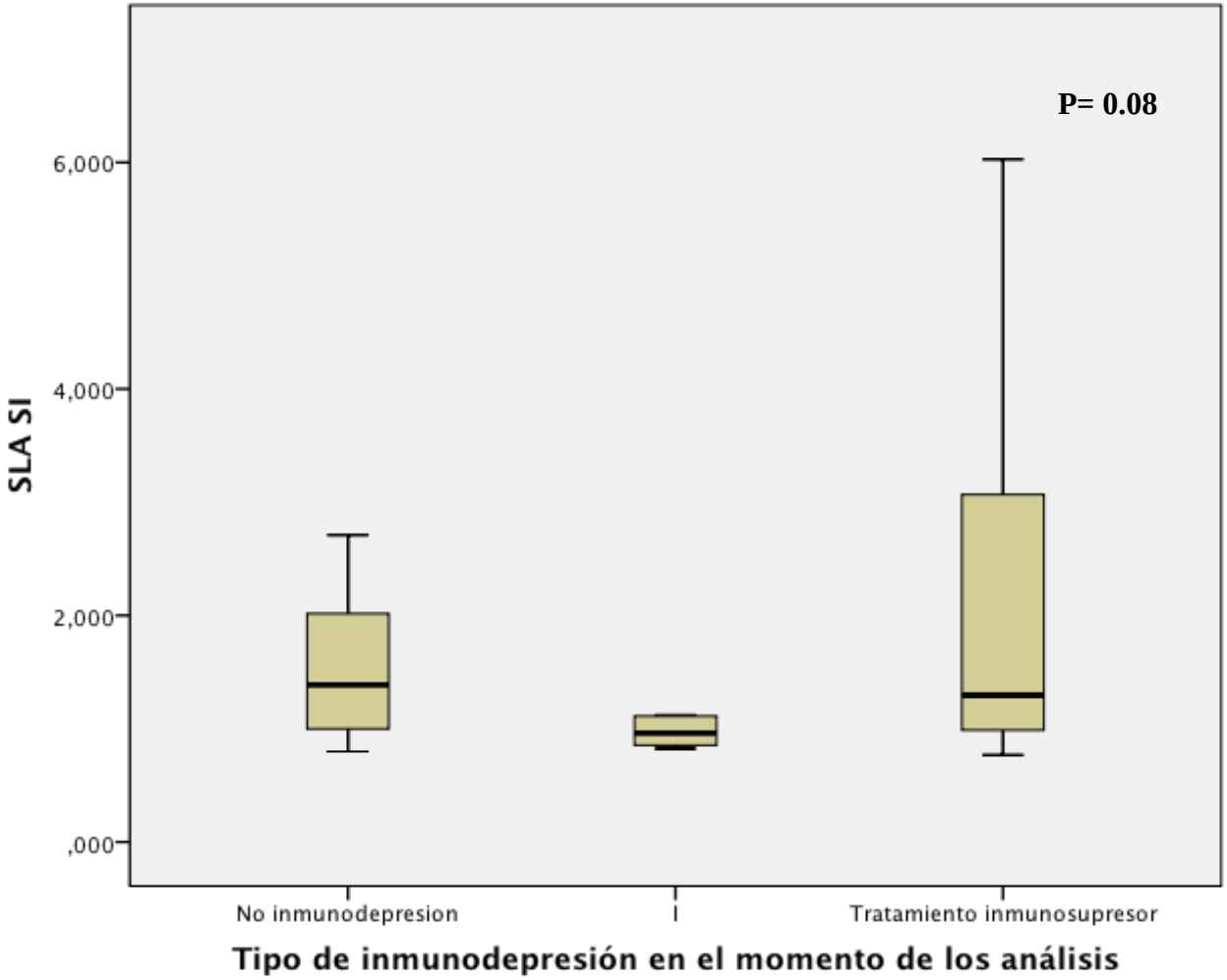
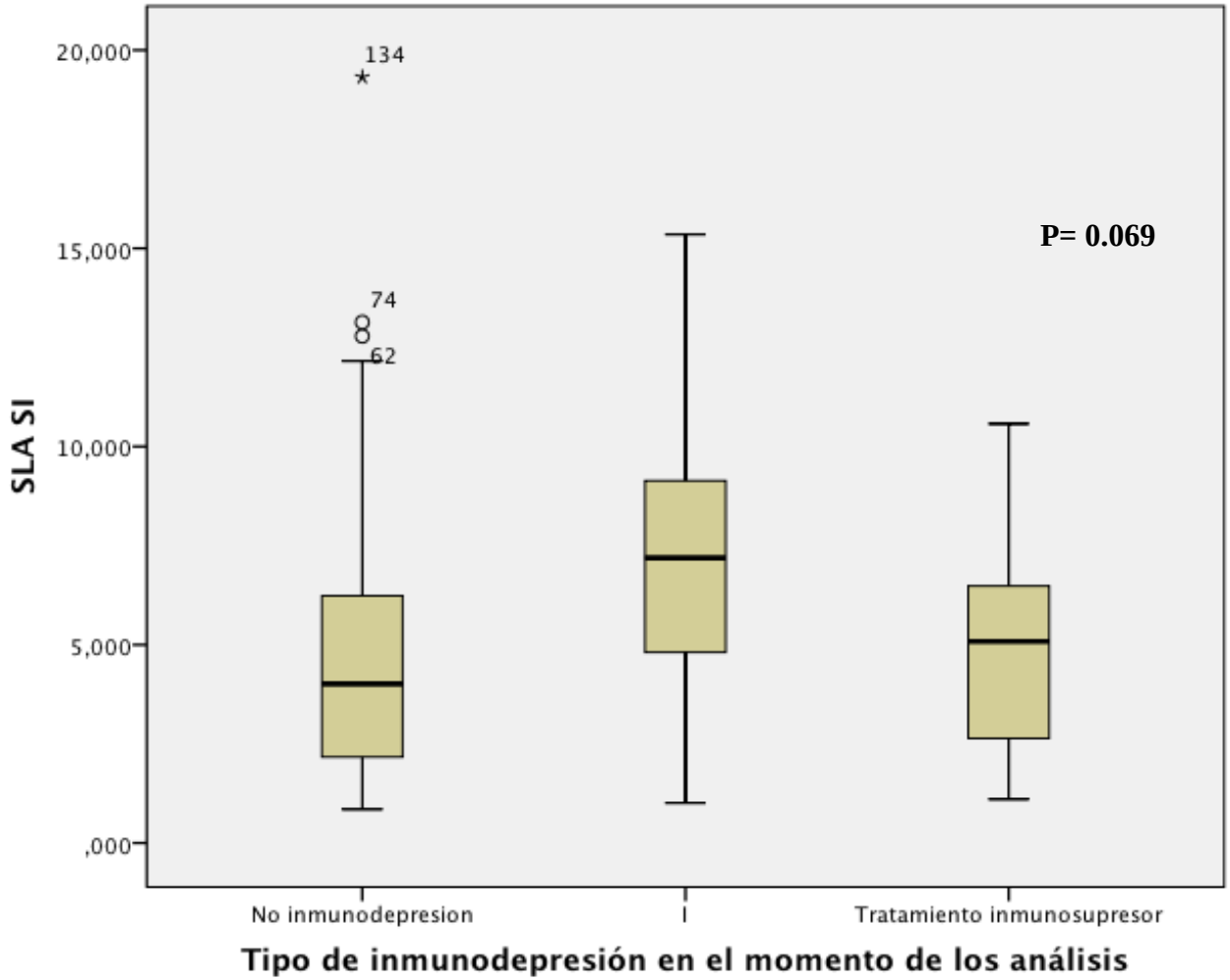


Figura 29. Diferencias en el índice de estimulación SLA entre los diferentes grupos en pacientes curados o en profilaxis.



OBJETIVO 5. Determinación de factores de riesgo para la exposición y el desarrollo de leishmaniasis en subpoblaciones (coinfección con VHC, raza negra...)

Uno de los objetivos de esta tesis ha sido establecer si existen factores de riesgo asociados a estar expuesto dentro de la población VIH y dentro de los pacientes VIH que se han expuesto, si existe algún factor de riesgo para desarrollar la enfermedad.

5.1 Factores de riesgo para la exposición a Leishmania infantum durante el brote

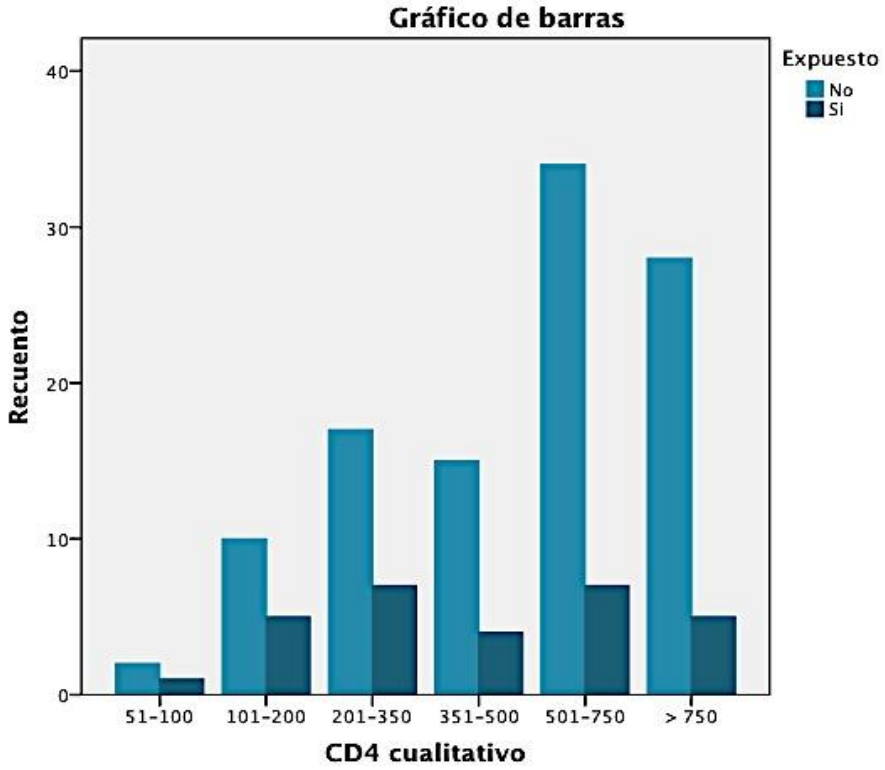
Se ha realizado un análisis para observar qué factores podrían estar interviniendo en el hecho de haber estado expuesto a Leishmania sin haber desarrollado la enfermedad, o en otra palabras, saber el porqué de que algunos pacientes hayan estado expuestos y otros no.

De 135 pacientes, 31 pacientes son considerados como pacientes expuestos (según las definiciones mencionadas previamente) y 104 no han estado expuestos.

Como se puede observar en la tabla 16, el único parámetro que se ha mostrado estadísticamente significativa con la variable "paciente expuesto" es la distancia al parque (ANOVA p=0.017), observándose una mayor proximidad al parque en pacientes expuestos (con una media de 1082m frente a la media de los pacientes no expuestos, que es de 1719 m). Se excluyeron de este análisis aquellos pacientes que viven fuera de Fuenlabrada y los pacientes de Humanes, quedando 79 pacientes no expuestos y 25 expuestos. Durante la realización del análisis, observamos una diferencia estadísticamente (p=0.004) que indica que los pacientes de raza negra, viven más cerca de la zona del parque (1671,75 m de media frente a 656 m en el grupo de raza negra).

No se han observado diferencias en los niveles de CD4 que presentaban los dos grupos en el momento del estudio (p=0.60) (Figura 30).

Figura 30. Niveles de cualitativos de $CD4^{+}$ en pacientes expuestos frente a no expuestos.



De los parámetros que no figuran en la tabla 16, cabe destacar que no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes expuestos en cuanto al subtipo de VIH B versus no B (p= 0,34), entre los diferentes genotipos de VHC (1, 3, 4 y 9) con una P= 0.319, y tampoco se han observado diferencias en cuanto a presentar hepatopatía en la ecografía independientemente de si existía hipertensión portal o no (p=0.40) o que le hepatitis estuviera curada o en tratamiento (p=0.55).

Ninguno de los pacientes estaba en tratamiento con ningún fármaco que pueda producir otro tipo de inmunodepresión (fármacos bilógicos, esteroides, metrotrexato).

No se observaron diferencias en cuanto a los lugares de origen de los pacientes (españoles, africanos, sudamericanos u otros) con una p= 0.77. Tampoco hubo diferencias en el modo de transmisión del VIH (MSM, heterosexual, UDVP o desconocido) con p=0,91.

Respecto al nadir de CD4 de los pacientes durante el brote, en el grupo de pacientes no expuestos la media del nadir de $CD4^+$ fue de 263 cells/μl (intervalo de confianza 95% de 228- 296 cells/μl) frente a la media del grupo de pacientes expuestos, que fue de 212 (intervalo de confianza 95% de 149- 275 cells/μl)(p=0.16). El 35% de los pacientes expuestos tuvieron un nadir menor de 100 CD4 durante el brote frente al 32% de los no expuestos (p=0.126). El nadir total no muestra diferencias significativas (ANOVA p=0.55).

Análisis multivariado:

En el análisis multivariado hemos incluido las variables de sexo, distancia al parque (en metros) , edad, nadir de $CD4^+$ en el brote y origen africano.

La única variable que mantuvo significación estadística fue la distancia al parque. El OR fue de 1.001 (IC 95% 1.000-1.002), p=0.004.

Tabla 16. Características epidemiológicas y clínicas entre pacientes expuestos y no expuestos.

CARACTERÍSTICAS		Expuesto		NO Expuesto		P (valor)
		No.	(%)	No.	(%)	
Sexo	Femenino	6	19,0	32	30,7	0.26
	Masculino	25	80,0	72	69,2	
Origen	Africano	10	32,2	22	21,7	0.21
	Blanco	21	67,7	74	71,1	
	Otros	0	0,0	8	7,6	
Distancia al parque (m)		Media 1210 (± 898)		Media 1702 (± 883)		0.017
Edad		Media 42,7 (± 10,4)		Media 44,5 (± 10,6)		0.47
ANTECEDENTES CLÍNICOS						
Cirrosis	No	29	93,5	102	98,1	0.226
	Si	2	6,5	2	1,9	
Cáncer	No	31	100,00	103	99,1	0.770
	Si	0	0,00	1	0,9	
Adherencia al TARGA	Mala	8	25,8	31	29,8	0.389
	Buena	23	74,2	70	67,3	
Hepatitis C	Si	7	22,5	30	28,8	0.330
	No	24	77,4	74	71,1	
Hepatitis B activa	Si	3	9,7	6	5,7	0.345
	No	28	90,3	97	94,3	
Menos de 100 CD4 durante el brote	Si	11	35,4	24	23,0	0.171
	No	20	64,5	80	76,9	
Última carga viral detectable (>50 copias)	Si	2	6,4	15	14,4	0.358
	No	29	93,5	89	85,5	

5.2 Factores de riesgo para desarrollar Leishmaniasis visceral durante el brote

En este apartado exponemos los resultados de los análisis univariantes para establecer si existen variables diferentes entre portadores asintomáticos y pacientes que han presentado enfermedad, que podrían ser potenciales factores de riesgo.

Varios de los factores analizados no han demostrado relación estadísticamente significativa (como se puede ver en la tabla 17). A nivel epidemiológico, no hay diferencias entre hombres y mujeres, y todos presentan una edad media similar. No se encontraron diferencias con respecto a la zona de origen o raza.

No hay relación entre el hecho de desarrollar enfermedad y presentar hepatopatía crónica en la ecografía (p=0.15) , ni se ha encontrado asociación con padecer coinfección con VHC (ningún genotipo) ni VHB.

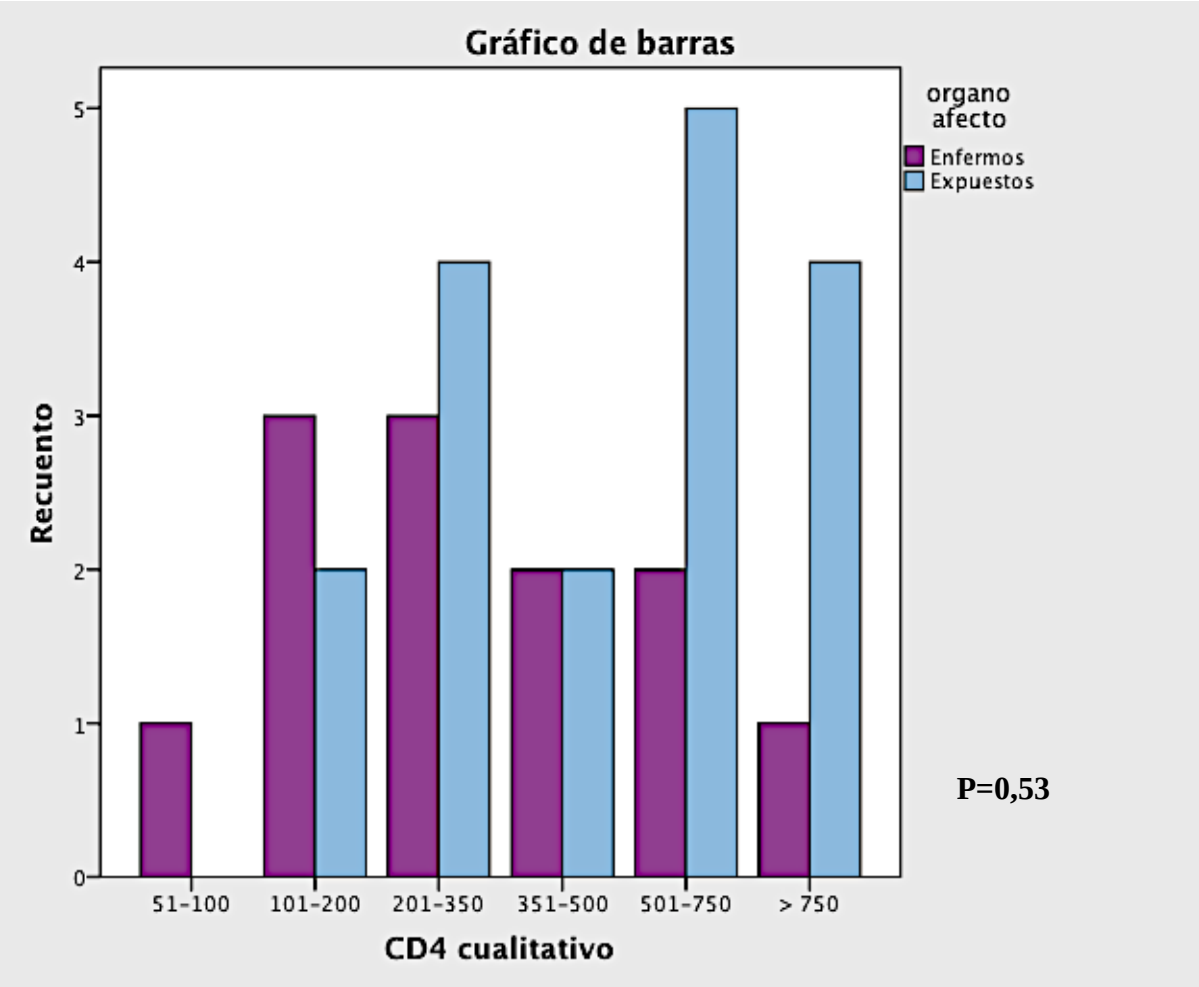
Con respecto a factores de riesgo asociados al propio VIH, no se objetivaron que el hecho de presentar resistencias (p=0.29) o el hecho de estar en tercera o cuarta línea de tratamiento tuviera influencia a la hora de favorecer el desarrollo de enfermedad. El subtipo de VIH B versus los no B tampoco han resultado estadísticamente significativos (p=0.819) ni tampoco la vía de transmisión del VIH (MSM, hetero, ADVP…) ni el tipo de tratamiento antirretroviral (incluidos los inhibidores de la proteasa).

Tabla 17. Características epidemiológicas y clínicas entre pacientes "portadores" y pacientes que han presentado enfermedad.

CARACTERÍSTICAS		PACIENTES ENFERMOS		PACIENTES "PORTADORES"		P (valor)
		No.	(%)	No.	(%)	
Sexo	Femenino	2	16,7	3	17,6	0,671
	Masculino	10	83,3	14	82,4	
Origen	Africano	4	33,3	5	29,4	0,568
	Blanco	8	66,7	12	70,6	
Edad		Media 43,0 (+ 10,6)		Media 42,6 (+ 10,5)		0,940
ANTECEDENTES CLÍNICOS						
Cirrosis	No	11	91,7	16	94,1	0,665
	Si	1	8,3	1	5,9	
Insuficiencia renal	Nunca	8	88,9	10	90	0,711
	FRA (actual o resuelto)	1	11,1	1	10	
Adherencia al TARGA	Mala	3	25	4	23,5	0,631
	Buena	9	75	13	76,5	
Hepatitis C	Si	2	16,7	5	29,4	0,422
	No	10	83,3	12	70,6	
Hepatitis B activa	Si	2	16,7	1	5,9	0,351
	No	10	83,3	16	94,1	
Menos de 100 CD4 durante el brote	Si	7	70,0	4	21,1	0,015
	No	3	30,0	15	78,9	
Última carga viral detectable (>50 copias)	Si	1	8,3	1	5,9	0,799
	No	11	91,7	16	94,1	

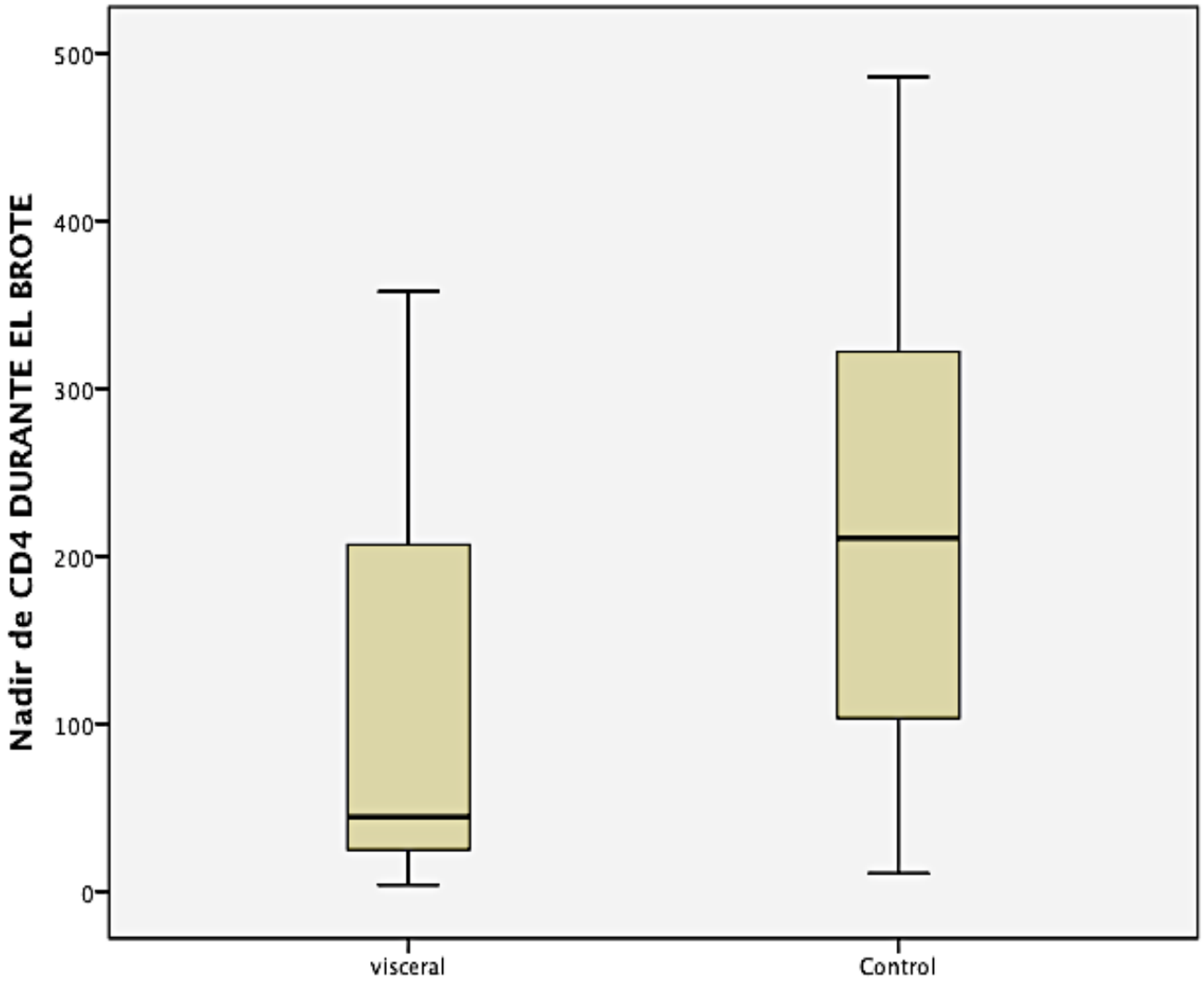
Dentro de los parámetros relacionados con la situación inmunológica de los pacientes, podemos ver en la figura 31 que no hay diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de los pacientes en los rangos de los niveles de $CD4^+$. En este gráfico, dentro de los que se consideran pacientes enfermos se engloban también los dos pacientes con leishmaniasis cutánea. Ambos se encuentran en el rango de 351-500 $CD4^+$. No obstante, al realizar el análisis excluyendo estos dos pacientes, no cambia de manera sustancial los hallazgos, con una p= 0.17.

Figura 31. Niveles cualitativos de $CD4^+$ en pacientes enfermos vs expuestos.



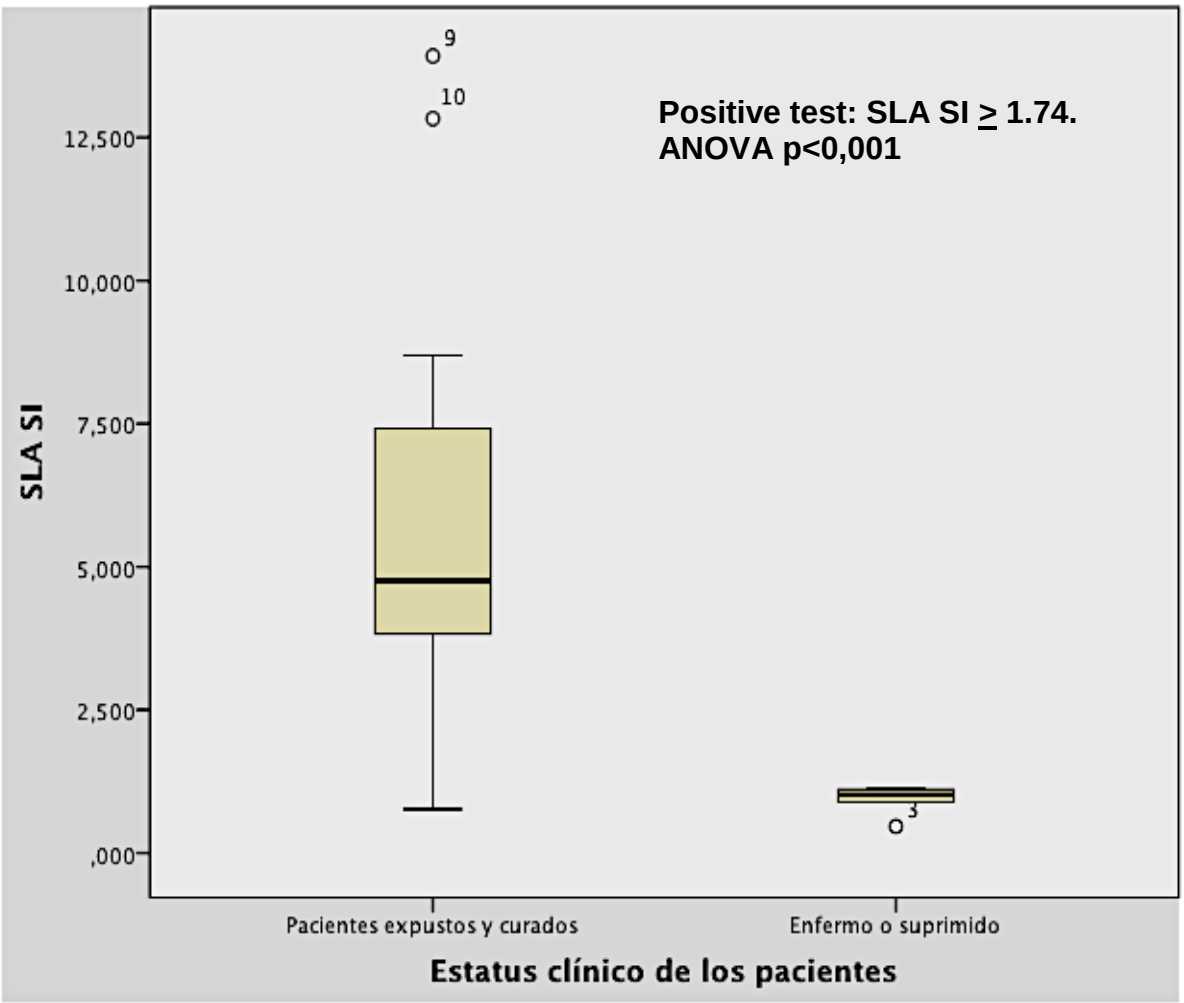
El hecho de haber presentado menos de 100 $CD4^+$ durante el brote, sí parece estar en relación con desarrollar leishmaniasis visceral con una Odds ratio de 8.75 (IC 95% 1,52- 50,11)(p= 0.015). También se observa una diferencia importante entre los nadires de $CD4^+$ durante el brote. En la figura 32 se puede observar que el nadir de $CD4^+$ en el grupo de pacientes con leishmaniasis visceral fue de 110,9 (IC 95% 15,25 – 206,55), frente a una media de 224 (IC 95% 148,1- 301,2), siendo esta diferencia estadísticamente significativa con ANOVA (p= 0,043).

Figura 32. Comparación de medias del nadir de $CD4^+$ entre pacientes y controles.



Finalmente, en cuanto a los resultados de la prueba de respuesta a antígeno soluble de leishmania (SLA); en el gráfico siguiente, se puede observar una diferencia estadísticamente significativa entre los índices de estimulación (SI) a SLA en los pacientes que han estado expuestos pero no han desarrollado la enfermedad (incluyendo aquí también los pacientes que se han curado) y aquellos que estaban enfermos en el momento de la extracción.

Figura 33. Muestra la comparación de las medias de SI entre los pacientes enfermos en el momento de la extracción y los pacientes expuestos que no han desarrollado la enfermedad y los curados.



Las media de índice de estimulación (SI) en el grupo de pacientes expuestos (y pacientes curados) es de 5.6 (intervalo de confianza 95% 4.32-6.91) y la media del grupo de pacientes enfermos en el momento de la extracción es de 0.93 (intervalo de confianza 95% 0.67-1.19).

Si se realiza el análisis de Chi cuadrado para ver la asociación de presentar de SLA negativo y estar enfermo, se observa que esta relación es estadísticamente significativa, con P<0,001 y un odds ratio calculado de 3.83 (IC 95% 1.9-7.6).

En el siguiente cuadro se pueden ver resumidos los hallazgos del análisis univariante realizado entre pacientes expuestos y enfermos.

Se observa una asociación de "Enfermo" con las siguientes variables:

- **Infectado con** SLA negativo **(PCR y/o serología positiva) : OR 3,83 (IC 95% 1.9 – 7.6) (p<0.001)**
- $CD4^+$ < 100 durante el brote: **OR 8,75 (IC 95% 1,52- 50,11) (p= 0,015).**
- **ELISA/IFAT positivo (OR no calculable p<0,001)**
- **PCR en sangre positiva OR 3,28 (IC 95% 6.09-1.78) (p= 0,046).**
- **rK39 positiva OR 5,9 (IC 95% 1.0-35) (p<0.001)**

Análisis multivariado:

En el análisis de todos los pacientes (realizados sobre 135 pacientes) excluyendo el resultado de SLA (por pequeño número de muestras), incluyendo las variables de edad, origen africano, cirrosis, y menos de 100 CD4 durante el brote, presentaron significación estadística: menos de 100 CD4 durante el brote con OR de 12.43 (IC 95% 3,12-49,57) con p< 0,001 y cirrosis con OR 8.34 (IC 95% 0,87-81,19) P=0,066.

Realizando el análisis a los paciente expuestos e incluyendo el resultado de SLA y las variables anteriores, sólo mantienen significación estadística el SLA con P<0,001 (OR no calculable) y menos de 100 CD4 durante el brote con P=0,001.

5.3 Análisis de factores de riesgo para enfermar (o no) en pacientes con menos de 100 $CD4^+$ durante el brote:

Había 28 controles que presentaron durante el brote menos de 100 $CD4^+$ y se realizaron análisis para ver si existía algún factor de riesgo que pudiera ayudar a predecir por qué ciertos pacientes con menos de 100 $CD4^+$ enferman y otros no. Se realizaron los análisis de las mismas variables comentadas previamente, incluido el SLA, sin que se encontrara ninguna diferencia estadísticamente significativa, ni con respecto al sexo, edad, modo de transmisión de VIH, coinfección con VHC ni VHB, cirrosis, adherencia al tratamiento, tratamientos inmunosupresores en el momento, etc.

Sin embargo si se analizan sólo los pacientes que con certeza están expuestos, nos quedan 14 pacientes, de los cuales los 7 con SLA positivo están curados y los 7 con SLA negativos no han presentado curación (son pacientes enfermos o suprimidos) p<0.001, OR no calculable.

OBJETIVO 6. Validar la utilidad del test de linfoproliferación a SLA como marcador de curación que permita la retirada de profilaxis secundaria

Como ya mencionamos, nuestra hipótesis se basa en que en aquellos pacientes con menos de 200 cel/µl CD_4^+ que presentaran una buena respuesta celular específica a SLA, se podría suspender la profilaxis de manera segura (o no iniciarla) y se podrían considerar pacientes curados.

Respuesta linfoproliferativa con SLA (Soluble Leishmania Antigen) en paciente coinfectados Leishmania/ VIH:

Durante el periodo del estudio, 13 pacientes desarrollaron leishmaniasis visceral y dos leishmaniasis cutánea. En el mes de marzo 2016 se diagnosticó un nuevo caso de leishmaniasis visceral que aún se encuentra en tratamiento.

Los dos pacientes con afectación cutánea presentaron respuesta celular negativa (test con SLA negativo). Ninguno ha recaído en el tiempo de seguimiento (uno 65 meses y 26 meses el otro). Los resultados del estudio parasitológico e inmunológico completo de ambos pacientes realizado tras el tratamiento se muestran en la tabla 18, a continuación:

Tabla 18. Resultados analíticos e inmunológicos de los dos pacientes VIH con leishmaniasis cutánea:

	PCR en sangre	CULTIVO	RK39	ELISA	IFAT	SLA
Paciente 1	Negativo	Negativo	Negativo	0,002	< 1/40	Negativo
Paciente 2	Negativo	Negativo	Negativo	0,017	< 1/40	Negativo

De los 13 casos de leishmaniasis visceral, dos fallecieron, uno debido a

complicaciones derivadas de una cirrosis y el otro paciente debido a una leucoencefalopatía multifocal progresiva. Un tercer paciente no acudió a las consultas de seguimiento que tenía programadas, por lo que se pudo realizar el seguimiento a largo plazo de 10 pacientes. Como se describió en el apartado de tratamiento, todos fueron tratados con anfotericina B liposomal y profilaxis posterior al tratamiento.

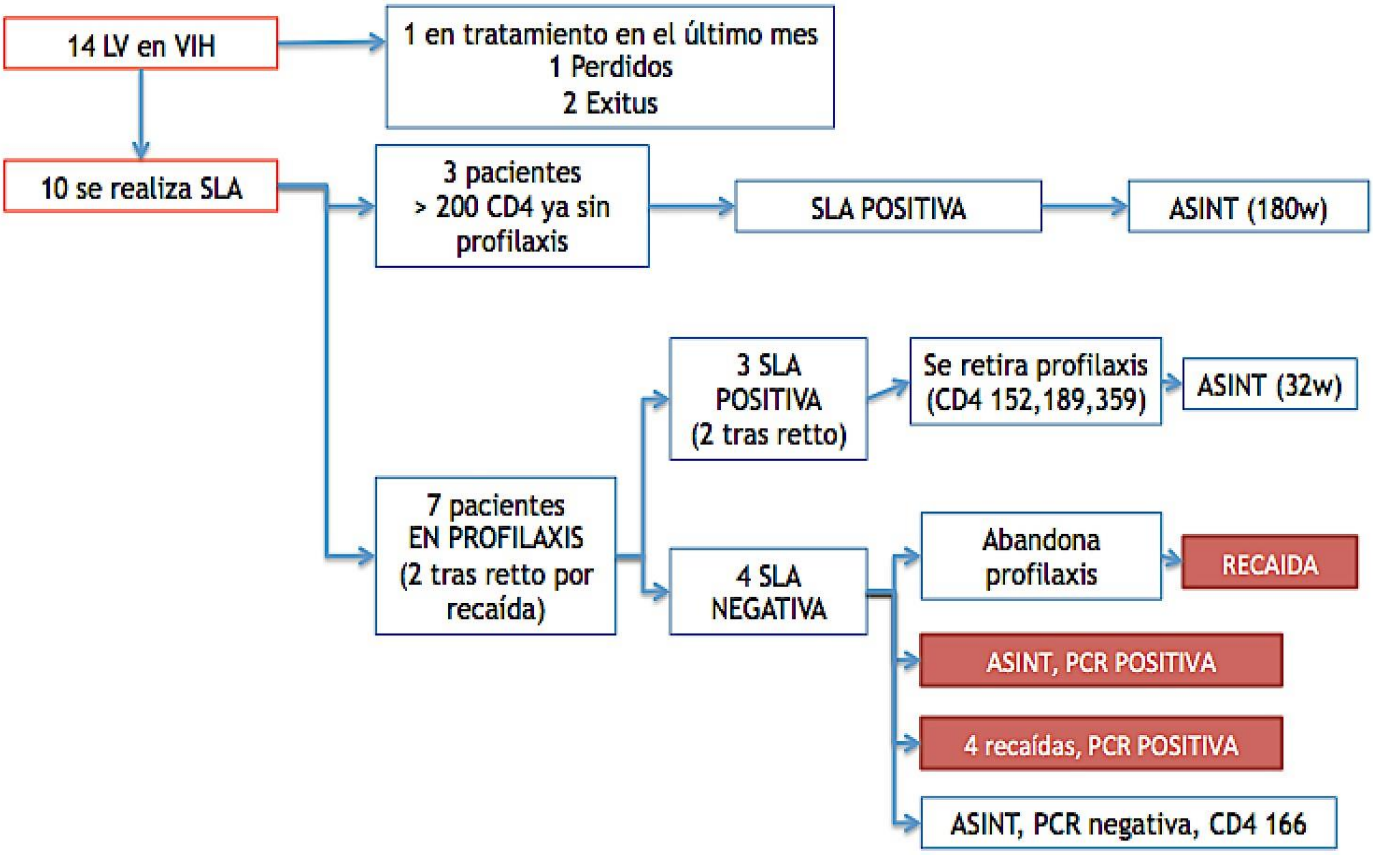
El progreso de la enfermedad de los pacientes a lo largo del tiempo nos permite realizar una agrupación conforme al tipo de evolución clínico-analítica que han presentado. Así pues, en el momento de realizar los test parasitológicos y de inmunidad, podemos distinguir tres tipos de pacientes (Figura 34):

a) Pacientes que tras el tratamiento de la leishmaniasis visceral estaban clínicamente curados y sin ningún tratamiento de mantenimiento, que habían conseguido de manera satisfactoria un nivel constante de $CD4^+$ por encima de 200 cel/µl, con una respuesta celular específica frente a Leishmania medida por SLA positiva (3 pacientes). Tras un período de seguimiento de 180 semanas se mantienen asintomáticos.

b) Pacientes que tras el tratamiento de la leishmaniasis visceral estaban asintomáticos pero estaban recibiendo profilaxis y tuvieron SLA positivo (3 pacientes). Estos pacientes se consideraron de bajo riesgo de recidiva y se les retiró la profilaxis, manteniéndose asintomáticos tras un período de seguimiento medio de 156 semanas. El contaje de CD4 en el momento de la retirada fue 152, 189 y 359.

c) Pacientes que tras el tratamiento de la leishmaniasis visceral cumplían un perfil de alto riesgo de recidiva, al tener SLA negativa (4 pacientes). 2 pacientes han recaído, uno está asintomático pero con PCR positiva y el otro se mantiene asintomático, pero todos ellos continúan con profilaxis.

Figura 34. Evolución de los pacientes según resultado de SLA.



En la tabla 19, se puede ver que en total 6 de los 10 pacientes presentaron un test de respuesta a antígeno soluble de leishmania (SLA) positivo. En cuanto a la media de $CD4^{+}$ de cada grupo, en los 6 pacientes con SLA positivo la media fue de 140 cel/mm3, frente a una media de 40.5 cel/mm3 en los 4 con SLA negativo (p=0.22).

El estatus clínico de los pacientes al final del seguimiento se muestra en la tabla 20. En la figura 35 se muestran los resultados del test SLA en índice de estimulación (SLA SI) en función del tiempo transcurrido tras el fin del tratamiento y el status clínico (curado/no curado). En la figura 36 se reflejan los resultados comparativos de los resultados de las medias de SLA SI en pacientes curados y pacientes no curados, bien porque presentan recaídas y porque están en profilaxis.

Tabla 19. Características de los pacientes al inicio del seguimiento (primer test).

	Semanas [a]	HAART[b]	Adherencia	CD4 (cells /µl)	SLA[c]	PCR Leishmania	IFAT[d]	Rk39	Profilaxis Secundaria	Profilaxis Secundaria después del test	Recaída
Paciente 1	61	TDF/FTC+DRVr	Correcta	68	Negativo	809	1/640	+	SI	Continuada	Recaída
Paciente 2	99	TDF/FTC+DRVr	Irregular	7	Negativo	327	1/320	+	No	Recomenzada	Recaída
Paciente 3	72	ABC/3TC+DRVr	Correcta	154	Negativo	3326	1/160	+	SI	Continuada	No
Paciente 4	37	TDF/FTC/EFV	Correcta	336	Positivo	Negativo	1/40	+	No	No	No
Paciente 5	329	DRVr+RAL+ETV	Correcta	307	Positivo	Negativo	1/160	Negativo	No	No	No
Paciente 6	48	ABC/3TC+EFV	Correcta	625	Positivo	Negativo	1/80	Negativo	No	No	No
Paciente 7	106	TDF/FTC/RPV	Correcta	189	Positivo	Negativo	1/40	Negativo	SI	Retirada	No
Paciente 8	234	TDF/FTC+LPVr	Correcta	359	Positivo	Negativo	1/80	Negativo	SI	Retirada	No
Paciente 9	50	ABC/3TC+LPVr	Correcta	136	Negativo	Negativo	1/80	Negativo	SI	Continuada	No
Paciente 10	83	TDF/FTC/EFV	Correcta	152	Positivo	Negativo	1/40	Negativo	SI	Retirada	No

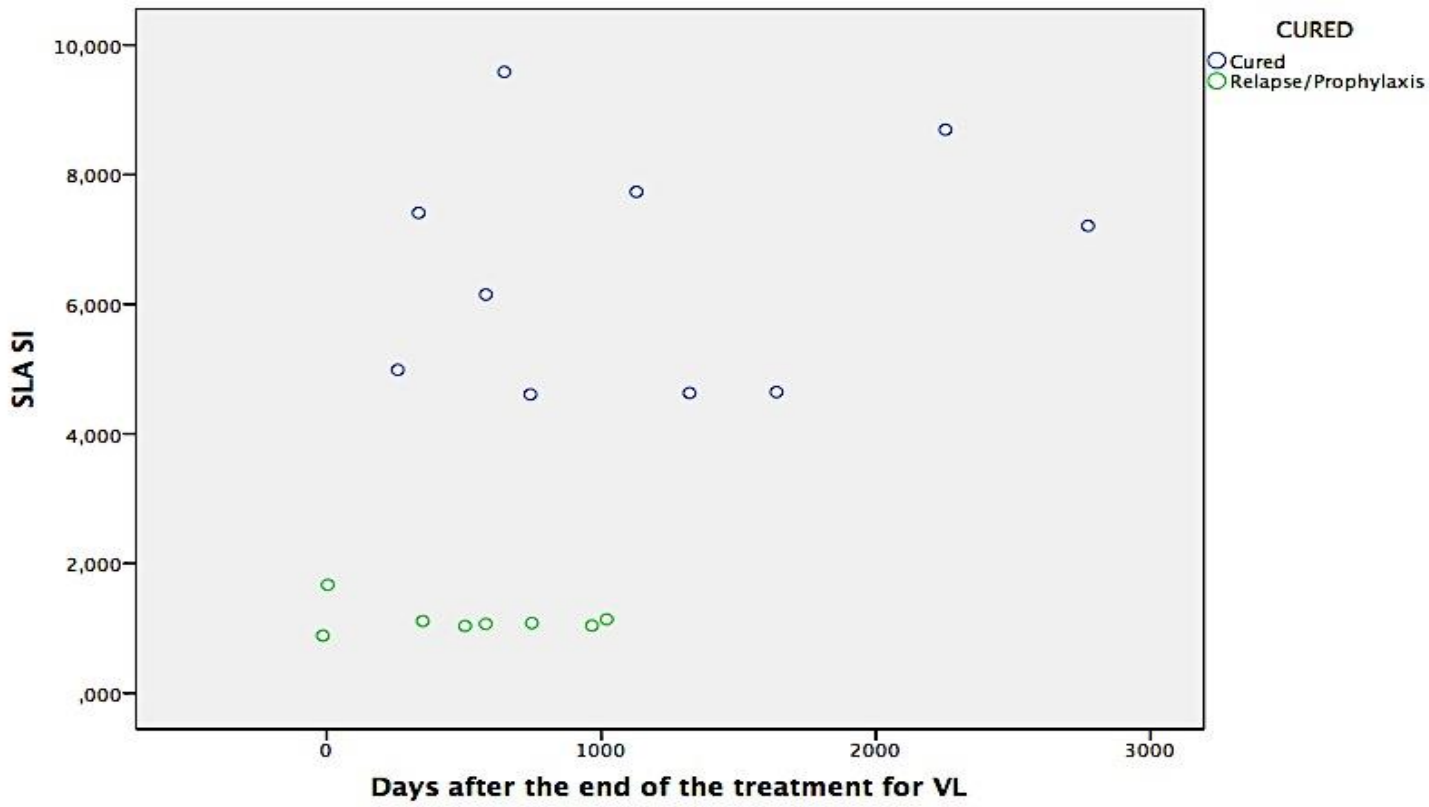
a. Tiempo en semanas desde el final del tratamiento y la realización de los tests.
b. HAART: highly active antiretroviral therapy. TDF: Tenofovir; FTC: Emtricitabine; DRVr: Darunavir/ritonavir; ABC: Abacavir; 3TC: Lamivudine; EFV: Efavirenz; RAL: Raltegravir; ETV: Etravirine; RPV: Rilpivirine; LPVr: Lopinavir/ritonavir
c. Test de estimulación con antígeno de Leishmania.
d. IFAT: Immunofluorescencia indirecta.

Tabla 20. Características de los pacientes al final del seguimiento (último test).

	Días de seguimiento	HAART [a]	Adherencia	Secondary prophylaxis	Últimos CD4	SLA [b]	PCR Leishmania (parasites/µg)	IFAT [c]	Rk39
Paciente1	167	3TC+DRVr+MRC	Correcta	Si	121	Negativo	29	1/160	+
Paciente 2	161	TDF/FTC+DRVr	Irregular	Si	68	Negativo	2888	1/160	-
Paciente 3	138	ABC/3TC+DRVr	Correcta	Si	111	Negativo	4092	1/160	+
Paciente 4	92	TDF/FTC/EFV	Correcta	No	601	Positivo	Negativo	Negativo	+
Paciente 5	394	DRVr+RAL+ETV	Correcta	No	322	Positivo	Negativo	1/80	Negativo
Paciente 6	160	ABC/3TC+EFV	Correcta	No	867	Positivo	Negativo	1/40	Negativo
Paciente 7	161	TDF/FTC/RPV	Correcta	No	345	Positivo	Negativo	1/80	Negativo
Paciente 8	300	TDF/FTC+LPVr	Correcta	No	219	Positivo	Negativo	1/80	Negativo
Paciente 9	146	ABC/3TC+RAL	Correcta	Si	166	Negativo	Negativo	1/40	Negativo
Paciente 10	189	TDF/FTC/EFV	Correcta	No	263	Positivo	Negativo	1/40	Negativo

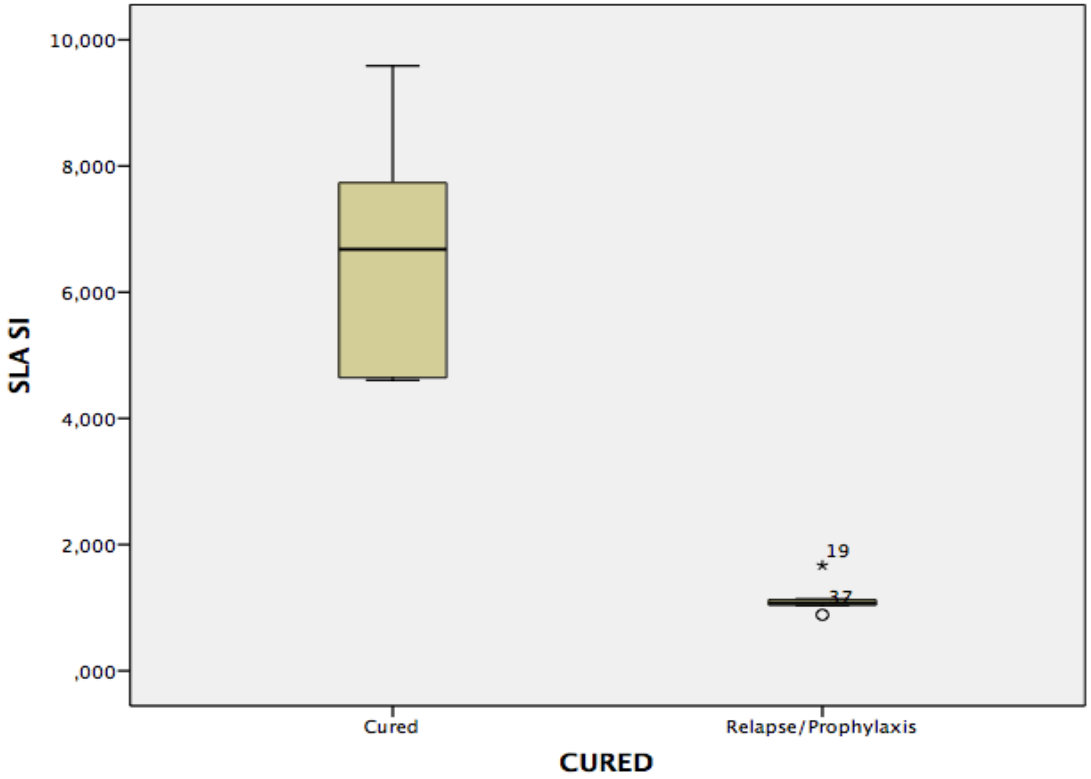
a. HAART: highly active antiretroviral therapy. 3TC: Lamivudine; DRVr: Darunavir/ritonavir; MRC: Maraviroc; TDF: Tenofovir; FTC: Emtricitabine; ABC: Abacavir; EFV: Efavirenz; RAL: Raltegravir; ETV: Etravirine; RPV: Rilpivirine; LPVr: Lopinavir/ritonavir.
b. Test de estimulación con antígeno de Leishmania.
c. IFAT: Immunofluorescencia indirecta.

Figura 35. SLA (soluble antigen of Leishmania), Stimulation Index (SLA SI), tras el final del tratamiento de la leishmaniasis visceral.



Test Positivo: SLA SI ≥ 1.74.

Figura 36. *SLA* (soluble antigen of Leishmania), Stimulation Index (SLA SI), de pacientes curados después de final del tratamiento de la leishmaniasis visceral.



Test Positivo : SLA SI ≥ 1.74.
ANOVA p<0.001

V.DISCUSION

DISCUSIÓN

Este trabajo es un estudio observacional, longitudinal de una cohorte prospectiva de pacientes, con recogida retrospectiva de los datos. Este estudio ha querido realizar una descripción exhaustiva de una parte del brote de leishmaniasis acontecido en Fuenlabrada a principios de 2009, y de manera más concreta, ahondando en la presentación clínica de la leishmaniasis visceral (y en menor medida leishmaniasis cutánea), las técnicas diagnósticas, factores de riesgo de exposición y enfermedad en los pacientes VIH de esta población.

A continuación, se discuten los resultados que hemos obtenido.

1. Homogeneidad de la muestra y población VIH

Como se puede observar en el Anexo 1, se realizaron diversos análisis para comprobar que la muestra extraída para nuestro estudio era representativa del conjunto de pacientes en las características más importantes. Se observó que efectivamente en los parámetros epidemiológicos inmunológicos, de tratamiento, etc… no ha habido ninguna diferencia relevante, no obstante, existen ciertos matices que merecen ser desarrollados.

Una de las primeras preguntas que se nos presentó cuando empezamos a analizar los resultados fue: ¿Son las características de nuestra cohorte de pacientes VIH parecida a las descritas en el resto de España y de manera más amplia, que las de Europa? Para contestar esta pregunta hemos consultado los registros de vigilancia epidemiológica del VIH y SIDA en España en la última actualización, que es del 30 de junio de 2015, y que detalla las características extraídas de los sistemas de información sobre nuevos diagnósticos de VIH del Registro Nacional de casos de Sida. Así podemos comprobar, que efectivamente

nuestra cohorte coincide bastante con el perfil de pacientes de nuevo diagnóstico en España (166).

Existe una mayor proporción de pacientes varones, como en nuestra cohorte, y la horquilla de edad más habitual es entre 25-35 años. Llama la atención que, en los nuevos diagnósticos, la forma de transmisión más frecuente en el Registro Nacional es de hombres que tiene sexo con hombres (HSH), mientras que, en nuestra muestra, el medio de transmisión principal es el heterosexual. Esto es probable a que sea debido a que estos datos son de diagnósticos recientes, y en los últimos años existe una tendencia ascendente de transmisión con una mayor incidencia de nuevos diagnósticos de VIH en HSH, mientras que nuestra cohorte se ha ido conformando en la última década, desde la apertura del hospital en 2004/2006. Además, nuestra cohorte tiene un mayor porcentaje de pacientes subsaharianos, en los que predomina la transmisión heterosexual.

Otra diferencia en nuestra cohorte es la proporción de pacientes inmigrantes y la población de origen subsahariano. Consultando los registros de España, se puede observar que los nuevos diagnósticos de VIH en pacientes que no son españoles presenta un ligero descenso y por lo tanto suponen menor peso desde el año 2011. No obstante, en 2014 un 32% de los nuevos casos diagnosticados se realizó en personas originarias de otros países siendo el origen más frecuente (tras el español) el origen latinoamericano (15,1%) y con un porcentaje menor de pacientes de origen subsahariano. Sin embargo, en nuestra cohorte tenemos un porcentaje muy elevado de paciente procedentes de países africanos (24-27%) lo cual es muy superior al nivel nacional. Esta particularidad se debe a la composición de la población de Fuenlabrada, donde, por ejemplo, hasta un 9,1 % de la población tiene origen nigeriano. Esto evidentemente tiene consecuencias tanto en el perfil de paciente que atendemos (tipo de transmisión, adherencia al tratamiento, etc) como a la hora de

coinfecciones con otro tipo de enfermedades importadas.

A la hora de comparar la muestra seleccionada para estudio de los test parasitológicos y de inmunidad, uno de los problemas fue valorar la cifra de $CD4^+$ como riesgo para padecer leishmaniasis, ya que, aunque es un factor de riesgo conocido de esta enfermedad (102)(103)(225)(226), es una cifra muy cambiante y especialmente en los pacientes que partiendo de $CD4^+$ muy bajos inician tratamiento antirretroviral, y que habitualmente consiguen en pocos meses alcanzar cifras por encima de 200 $CD4^+$. Para salvar este sesgo utilizamos como referente el nadir de $CD4^+$, es decir, la cifra de $CD4^+$ más baja que el paciente ha tenido durante su evolución. Este parámetro es también un factor de riesgo asociado a peor pronóstico (102)(103) y es más estable en el tiempo que la cifra de $CD4^+$ en una analítica aislada. Esto permite comparar los grupos de forma más sencilla. Por este motivo, se pretendió incluir en el estudio al mayor número posible de pacientes con nadir de $CD4^+$ menores de 100 de la cohorte, y explica que sea la única variable con diferencia significativa entre el grupo global y el grupo de estudio al que se extrajeron los estudios analíticos. Este hecho refleja nuestro interés a la hora de reclutar a los pacientes en mayor riesgo de enfermedad.

2. ***Prevalencia de exposición a Leishmania infantum en pacientes VIH en zona de brote***

La prevalencia se define como la proporción de personas enfermas, o en este caso expuestas a un determinado factor o enfermedad en un momento puntual o en un periodo de tiempo. En nuestro estudio, hemos encontrado una prevalencia de exposición del 15.4 % en pacientes VIH, que es una prevalencia bastante alta si tenemos en cuenta que se trata de una enfermedad parasitaria de la que no ha habido hasta ahora brotes en Europa.

En nuestro estudio, se ha considerado a un paciente EXPUESTO, si cumplía una de

las siguientes condiciones:

- Paciente con infección documentada por Leishmania (visualización al microscopio de Leishmania, aislamiento de Leishmania por cultivo o detección de DNA de Leishmania por PCR en cualquier órgano o en sangre)

- Serología positiva usando técnicas basadas en rK39 (técnica cualitativa) o IFI (superior a dilución 1/40)

- Paciente que presenta respuesta celular positiva para Leishmania con el método de SLA.

Una de las principales dificultades, de los estudios de exposición, es su medición. Para medir la exposición a Leishmania, existen varias posibilidades dentro de las cuales, una de ellas es la medición a través del test de Montenegro o test de la leishmanina, que es una prueba similar al Mantoux, que se realiza en diversos países, y ha sido utilizado de manera frecuente en países endémicos para este propósito. El problema de dicha prueba en nuestro país, es que se trata de una técnica que no está aprobada por la Agencia Europea del Medicamento, y por lo tanto, no está disponible en España.

La serología como único método no es suficiente ya que se sabe que no se positiviza en muchos pacientes con formas leves de leishmaniasis. La técnica de SLA se ha comprobado en estudios recientes, que presenta buenos resultados en un trabajo similar en trasplantados(167), por ello decidimos usar una combinación de técnicas que aumentaran la posibilidad de detectar expuestos.

Los pacientes se categorizaron en pacientes expuestos asintomáticos, que son aquellos que cumpliendo las premisas anteriores no presentaban ningún síntoma que pudiera hacer

sospechar que presentaban la enfermedad. Cabe destacar una definición que hemos realizado en nuestro estudio, que nos parecía interesante, que define a pacientes expuestos que presentan alto riesgo de padecer Leishmaniasis visceral. Estos pacientes serían aquellos que cumplen la definición de exposición previa y que además presentan respuesta celular específica para Leishmania negativa (SLA negativo). En contraposición, los pacientes asintomáticos expuestos que presentaran respuesta celular específica para Leishmania positiva podrían considerarse, según nuestro criterio, pacientes con bajo riesgo de padecer leishmaniasis. Este punto se desarrollará de manera más amplia y detallada en un apartado más adelante.

Como ya hemos mencionado previamente, los estudios sobre la epidemiología en leishmaniasis visceral son complejos, ya que la mayor parte de los casos se dan en países en vías de desarrollo que cuentan con pocos medios técnicos para el diagnóstico, tratamiento, y por lo tanto carecen de posibilidades de realizar estudios a este nivel. También se une como problemática, la ausencia, en ocasiones, de registros de población, censos y la ausencia de declaración de determinadas enfermedades. En Europa se han realizado varios estudios que ya hemos mencionado en el capítulo de epidemiología, que describen la incidencia y el desarrollo de la enfermedad, pero lo que no se ha podido realizar hasta ahora era un estudio en un área de brote epidémico, ya que, en Europa, este es el primer brote de leishmaniasis visceral que acontece en las últimas décadas. Esto nos ha brindado la posibilidad de observar cómo se comporta el brote e intentar estimar la prevalencia de exposición en pacientes VIH asintomáticos durante un brote en una zona de alta endemia, pudiendo estimar la población en riesgo de desarrollar leishmaniasis visceral en caso de que estos desarrollaran una inmunosupresión.

Durante las últimas décadas, se han declarado diversos brotes, todos localizados en

el continente africano, lo que complica su estudio a pesar de los grandes esfuerzos de organismos no gubernamentales como Médicos sin fronteras, que ha realizado diversos estudios en colaboración con la OMS y WHO.

Se han declarado brotes en Wajir (Kenya) en 2008, y un brote especialmente devastador en Jonglei y la zona alta del Nilo en Sudán de sur durante el periodo de 2009-2012 con más de 76,000 casos de sospecha de leishmaniasis visceral . En ambos casos no se han podido realizar estimaciones de prevalencias ni prevalencias de exposición, por los mismos motivos, tampoco en paciente especialmente vulnerables, como lo son los pacientes VIH.

Especialmente interesante es el caso del brote declarado entre 2005-2006 en Libo Kemkem, Etiopía, con más de 1841 pacientes diagnosticados. En este caso al no disponer cifras de población exacta, ni pacientes con correcto seguimiento fue imposible estimar medidas epidemiológicas (168), no obstante, existen bastantes estudios realizados posteriormente, que intentan estimar la prevalencia e incidencia de leishmaniasis visceral.

Uno de los pocos estudios cuyo objetivo era establecer tasas de prevalencia, es un estudio realizado en Etiopía tras el brote sufrido en 2005-2006 (169). En esta área, no existía previamente ningún caso descrito de leishmaniasis visceral, y fue tras el brote que comenzaron a declararse un número muy aumentado de casos (170). El caso de este brote ha sido especialmente curioso, ya que previo a este periodo, no existían notificación de casos de leishmaniasis visceral en esta zona, por lo que ha sido objeto de numerosos estudios para dilucidar el porqué de este brote.

Entre numerosas respuestas se encuentra el hecho de que hubo una importante migración de personas (previamente no expuestas a leishmaniasis y sin inmunidad) a un área colindante de Sudán donde sí existe una declaración habitual de casos, y se postulan

también como factores importantes el impacto en la zona del cambio climático, ya que se cree que podría haber habido un cambio en las características de la tierra en la zona y un cambio en la temperatura, ya que a la altura a la que se encuentra dicha área (1,800/2,000 m) a está altitud no deberían encontrarse flebotomos.

En este estudio, que se realizó unos dos años después del brote, se realizó un trabajo para determinar las prevalencias tras el brote, principalmente en población de niños de hasta 15 años. La prevalencia se intentó establecer considerando expuestos a los pacientes que presentaran positivo en el test rápido rK39 y el test de aglutinación directa (DAT), así coma la prueba intradérmica con leishmanina (LST) que consiste en la inoculación de extractos parasitarios en la piel y observar si se produce una reacción de hipersensibilidad de tipo celular (IV) (parecida a la prueba de Mantoux para la tuberculosis). La prevalencia global que se encontró fue de 1.02% (95% CI = 0–4.54).

Como podemos ver esta prevalencia es sustancialmente más baja que la que hemos encontrado nosotros, no obstante, una de las conclusiones del artículo era que pensaban que los niveles de prevalencia existentes durante el estudio, mostraban que se había vuelto a un estatus pre epidémico, con prevalencias parecidas a las previas antes del brote. Esto a su vez llama la atención, ya que impresiona un descenso tan impresionante en la prevalencia, lo que contrastaría con la situación de nuestro brote, que parece en descenso, pero que todavía no ha bajado a niveles pre epidémicos.

Merece especial mención el estudio realizado en el sud-oeste de Etiopía donde se analizaron 1232 pacientes que no habían sido tratados previamente, para estimar la prevalencia global de la positividad de LST, del test de aglutinación directa (DAT) y leishmaniasis visceral activa, con unas positividades respectivas de 30.0%, 5,4% y 0.49% (171). Existe otro estudio con LST realizado en Mali donde se estiman prevalencias de

leishmaniasis cutánea, y donde reportan prevalencias de positividad de LST que van desde 19,9% a 45,4%(172). Aún así, hay que mencionar que existen ciertas limitaciones cuando se trata de la interpretación de LST y que en estos estudios se habla o bien de leishmaniasis cutánea , como en el caso de este último estudio, o de leishmaniasis visceral en población general (173). Si la búsqueda se restringe a pacientes VIH, los estudios se ven mucho más restringidos, ya que ciertas pruebas como las LST o ciertas pruebas inmunológicas, en pacientes VIH son muy poco fiables.

Hay un estudio realizado en el este de España (174) en el que se realizó una prueba de IFAT (detecta la presencia anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta) a 179 pacientes VIH asintomáticos durante un seguimiento de un año, encontrándose una positividad en seis de los pacientes (3%). Con la limitación de este tipo de pruebas en pacientes VIH muy inmunodeprimidos, que pueden dar falsos positivos (en este estudio hubo un paciente con severa inmunodepresión que dio negativo en IFAT, pero que presentaba leishmaniasis visceral que fue confirmada con test parasitológicos).

Otro reciente estudio, realizado sobre prevalencia de exposición, esta vez en población trasplantada, encontró una prevalencia de exposición de toda la muestra de trasplantados de un 21%(167), que es similar a la de nuestros pacientes VIH.

Como conclusión, con estos datos podemos constatar que la situación actual en Fuenlabrada es inquietante, con prevalencias actuales similares a las que existen en determinadas áreas africanas, además, la posibilidad de tener datos estimados en el brote de Madrid puede ayudar a calcular los posibles afectados en brotes de otros lugares, aunque como vemos, los datos oscilan mucho. Aun así, el conocimiento en profundidad de nuestro brote, puede ayudar a perfilar y mejorar las estrategias de manejo durante estos brotes en otros lugares, aún con todos los factores limitantes que existen y teniendo en

cuenta determinadas diferencias en las características de las diferentes poblaciones y el hecho de que en áfrica y otras regiones, la leishmaniasis se debe a L. Donovani, etc…

3. ***Determinar la incidencia acumulada y la tasa de incidencia de Leishmaniasis visceral en la cohorte VIH en zona de brote***

Uno de nuestros objetivos ha sido establecer la estimación de la tasa de incidencia de leishmaniasis visceral en la cohorte de pacientes VIH que viven en la zona de brote.

En España, desde el año 1996 hasta el año 2011, se ha mantenido una incidencia anual más o menos estable de leishmaniasis, de aproximadamente 0,45 casos/ 100.000 habitantes. Durante este periodo, Madrid había alcanzado su pico en 2006 con una tasa de incidencia de 0,59/ 100.000 hab.

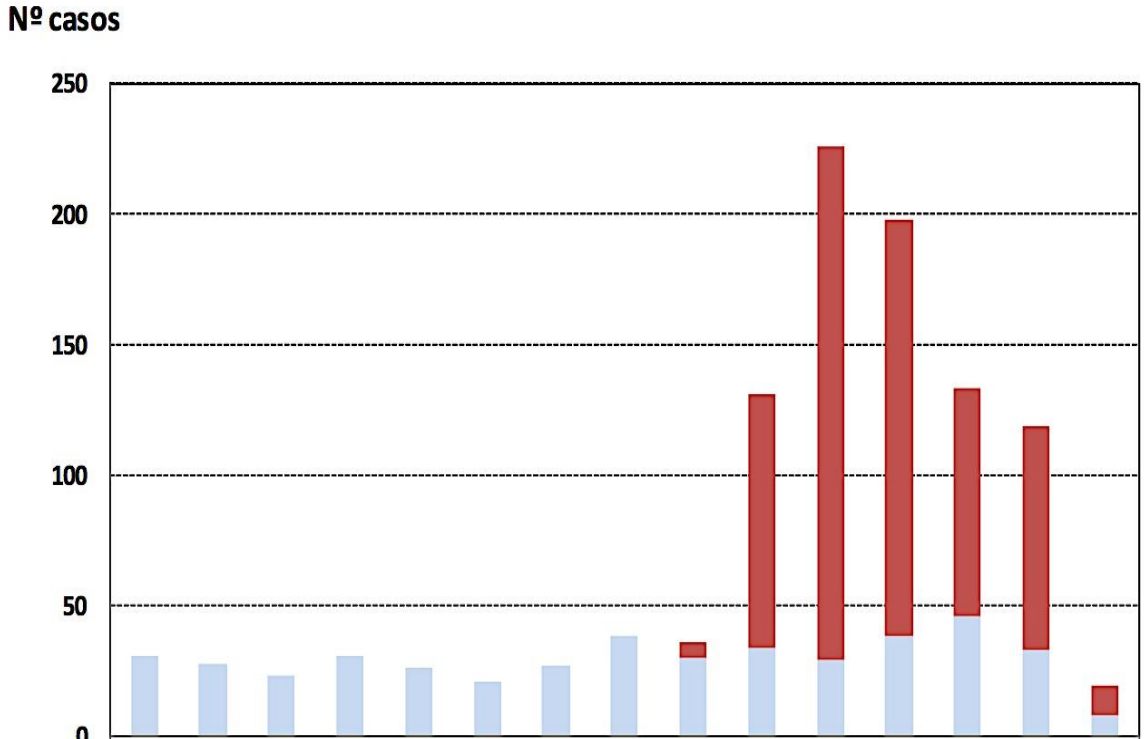
Desde el años 2009, en la comunidad de Madrid se ha dado un pico muy importante en la tasa de incidencia, a expensas de los casos declarados en el brote de Fuenlabrada, dándose un incremento con tasas de incidencia de hasta 21,54 casos / 100.000 habitantes (datos obtenidos del informe de 2012 sobre el riesgo de transmisión de Leishmania infantum realizado por Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES)).

En el informe realizado en septiembre de 2015 por la dirección General de Salud Pública, se puede comprobar como la incidencia va aumentando a partir de 2009, con un pico en 2011, procediendo después a disminuirse ligeramente el número de casos, pero sin llegar a los niveles previos. En la Figura 37, extraído de este informe se pueden ver la evolución temporal de los casos notificados durante el brote a las EDO (enfermedades de declaración obligatoria).

Se ve claramente un pico de incidencia en 2012, disminuyendo posteriormente en

los años posteriores. En total en Fuenlabrada han sido declarados 534 casos de los cuales 180 eran leishmaniasis viscerales (incluyendo en esta definición la leishmaniasis ganglionar). En nuestro hospital se han seguido 110 casos de leishmaniasis visceral, de la que 14 eran pacientes VIH, lo que supone un 12,7%.

Figura 37. Evolución temporal del número de casos declarado a las EDO (enfermedades de declaración obligatoria).



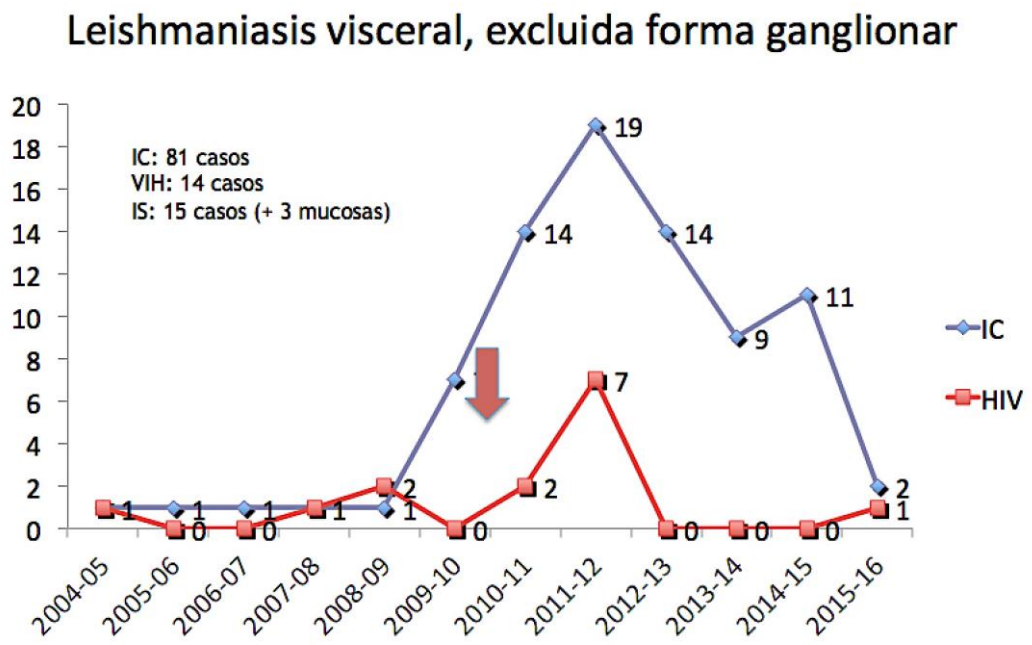
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
TOTAL	31	28	23	31	26	21	27	38	36	131	226	198	133	119	19
BROTE									6	97	197	160	87	86	11
NO BROTE	31	28	23	31	26	21	27	38	30	34	29	38	46	33	8

Fuente: Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO).

En el caso de la leishmaniasis visceral en pacientes VIH, la distribución ha permanecido parecida. Como se puede ver en nuestra serie (Figura 38), hay un pico de incidencia claro entre 2011/2012, que es donde aparecen la mitad de los casos de leishmaniasis visceral en pacientes VIH. Posteriormente se mantienen unos niveles muy

bajos, sin ningún caso hasta el 2016. Este descenso de casos, que también se ha comprobado en pacientes inmunocompetentes, se asocia con las medidas adoptadas para frenar el brote, con mayor control del reservorio, los vectores, así como las campañas de información sobre el brote, que se implementaron fundamentalmente desde la primavera de 2011.

Figura 38. Número casos de leishmaniaisis visceral en pacientes inmunocompetentes y VIH.



Como podemos ver, en la población VIH y como es de esperar, la tasa de incidencia es mucho mayor que en la población general, que ya era mayor antes del brote (305.0 por 100.000 pacientes-año). Sorpresivamente, o bien porque ya partimos de una tasa alta, el impacto del brote en la población VIH ha elevado la tasa a 413.4 casos por 100.000, un aumento proporcionalmente muy pequeño si lo comparamos con el aumento de la tasa global (0.45 a 21.5). Sin embargo, queda claro que la tasa de incidencia ha sido 20 veces superior a la estimada para la población general, lo que permite prever el impacto

que podría tener un brote como éste en zonas donde existe de base muchos pacientes VIH como en determinados lugares de África, India o Brasil.

Si comparamos nuestro datos frente a algunos datos epidemiológicos recogidos entre 1997-2008 (175), podemos ver varias diferencias. Antes es preciso mencionar que los datos extraídos desde 1997-2008 son basado en el CMBD (conjunto mínimo básico de datos), con las limitaciones que esto conlleva, aun así, son datos que pueden orientar hacia las tendencias de lo que estaba ocurriendo a nivel epidemiológico durante ese periodo de 12 años.

Durante este periodo se objetivó que de todos los pacientes declarados con leishmaniasis visceral, un 37% eran VIH positivos, que es la primera diferencia que encontramos, ya que nuestros pacientes VIH representan un 12% del total. Si cogemos sin embargo la evolución temporal desde el 2000 al 2003, vemos que van aumentando los casos en pacientes no VIH y que los casos de coinfección bajan del 22,6% a 19,9% (176).

Hay que tener en cuenta que estos estudios comprenden ingresos ocurridos entre 1997 y 2008, presentando en los primeros años menos porcentaje de pacientes VIH en tratamiento con TARGA, y por ende es de suponer que habría pacientes en peor situación inmunológica, lo que podrá explicar esta diferencia.

4. ***Leishmaniasis cutánea en pacientes VIH de nuestra cohorte***

En nuestra cohorte sólo se han producido dos casos de pacientes VIH que han desarrollado leishmaniasis cutánea. Como ya se mencionó en el apartado de resultados de 357 casos de leishmaniasis cutáneas declaradas en nuestro hospital, sólo dos pacientes presentan coinfección con VIH. Con otros tipos de inmunosupresión, encontramos otros 4

pacientes que estaban en tratamiento con anti-TNF, metotrexate o corticoides. Llama la atención el bajo número de pacientes inmunodeprimidos que desarrollaron leishmaniasis cutánea, aunque este hecho está en relación con que, al presentar una buena respuesta inmunológica, la presentación clínica permanece como una leishmaniasis cutánea localizada, aunque en paciente con mala inmunidad, existe más probabilidad de presentaciones atípicas y evolución a formas más agresivas y diseminadas, e incluso que lo que se produzca sea una leishmaniasis visceral en vez de cutánea.

Como ya se ha mencionado previamente, la leishmaniasis cutánea en la cuenca mediterránea está producida por L.*infantum*, como en nuestro caso, aunque la presentación clínica habitual descrita en pacientes inmunocompetentes difiere ligeramente de la que han presentado nuestros pacientes como se comentará más adelante.

En la coinfección Leishmania/VIH, el hecho de presentar leishmaniasis cutánea es excepcional, siendo más frecuente la presentación de leishmaniasis visceral. Por ejemplo, en el documento publicado por WHO en el año 2000, hicieron un análisis retrospectivo de 965 casos de coinfección de los cuales solo el 4% presentaron leishmaniasis cutánea localizada(177). Mientras que en otras zonas como India, Brasil (178) y zonas del este de áfrica es una presentación mucho más habitual, en Europa, queda reducida a una excepción.

La forma de presentación clínica de leishmaniasis cutánea durante nuestro brote muestra algunas diferencias a la previamente descrita en otros estudios (179). Se han observado una mayor presencia de lesiones atípicas, con más frecuencia de lesiones en forma de pápulas y placas eritematosas sin formación de costra y mayor presencia de lesiones múltiples. La lesión más típica descrita es la de “botón de oriente” (lesión única pápulo-nodular con costra). Nuestros dos pacientes coinfectados presentaron ambos

lesiones únicas, una de ellas más parecida a un botón de oriente, ya que se trató de una pápula única ulcerada y las lesión del otro pacientes fue más atípica, siendo este diagnosticado por biopsia por sospecha de carcinoma basocelular. En ambos casos se diagnosticaron por estudio anatomopatológico (donde se observaron granulomas no necrotizantes) con PCR para leishmania positiva en la muestra.

Ninguno de los pacientes presentó clínica sistémica ni alteraciones analíticas sugerentes de leishmaniasis visceral, ni tampoco presentaron adenopatías palpables.

La presentación de leishmaniasis cutánea en pacientes VIH se ha asociado a un estado inicial del VIH donde todavía no existe una inmunodepresión profunda. Tradicionalmente la presentación clínica es similar a aquella presentada en individuos VIH negativos tanto a nivel clínico como histopatológico, lo que cuadra con la presentación clínica de nuestros pacientes (103). En un estudio de casos-controles con 9 pacientes VIH positivos con leishmaniasis cutánea frente a pacientes VIH negativos, realizado en la Guayana Francesa (180), se encontró que estos pacientes presentaban efectivamente una misma clínica, pero que presentaban mayores tasas de recurrencia y peor respuesta al tratamiento. Esto difiere de nuestra experiencia, ya que en nuestros dos pacientes, ambos presentaron excelente evolución con tratamiento intralesional con antimoniato de meglumina (un paciente con tres dosis y el otro con 2) y no han presentado hasta la fecha ninguna recidiva (tiempo de seguimiento de 4 años en uno de los pacientes y 6 años en el otro). Estas diferencias pueden explicarse por ser una cepa diferente de leishmania (L. *guyanensis*) y el hecho de que fueron tratados de manera diferente con ciclo de pentamidina en vez de antimoniales.

Con respecto al nivel de inmunosupresión, tanto en este estudio mencionado previamente, como lo que aparece publicado en otras revisiones, todos los pacientes suelen

presentar niveles de > 200 $CD4^+$ cel/ µl. En el caso de nuestros pacientes, ambos tenían $CD4^+$ por encima de 350 cel/ µl, y uno de los pacientes no estaba en tratamiento con TARGA por tener niveles superiores a 400 cel/ µl.

En cuanto a las pruebas diagnósticas realizadas, ya hemos visto que el diagnóstico fue clínico con posterior PCR en biopsia positiva, pero que no se vieron leishmanias. En cuanto al resto de pruebas que se realizaron, en ambos pacientes la PCR en sangre, el cultivo, el testo rápido rK39 y el IFAT fueron negativos. Esta negatividad, lo que evidencia, es que de alguna manera la leishmaniasis cutánea parece una reacción muy local que queda confinada a la piel gracias al desarrollo de una buena respuesta inmune(103). A nivel histológico se produce daño de las células, edema, con gran necrosis, que posteriormente es remplazada por células de Langerhans y epitelioides, produciéndose la curación. En los pacientes inmunocompetentes, parece que ocurre de manera similar.

Con respecto a la respuesta frente a antígeno soluble de leishmania (SLA), en ambos casos los pacientes presentaron un SLA negativo, con un índice de estimulación (SI) de 0,76 y 0,93 (el límite establecido fue de la media + 3 DS del SI que fue de 1.88). Resultados preliminares no publicados por Carrillo E. y Moreno J, de la Unidad de Leishmaniasis del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII), y presentados en la III REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA RICET (Madrid, 11 y 12 de junio de 2014), muestran el mismo comportamiento en inmunocompetentes con leishmaniasis cutánea. Esto que permite formular la hipótesis de que la leishmaniasis cutánea estimularía una protección cutánea y localizada, pero no estimularía una respuesta celular sistémica frente a Leishmania. La leishmaniasis cutánea al ser una inoculación local que es muy bien controlada a nivel inmunológico destruiría los parásitos de manera completa, y no generaría una respuesta inmunológico ni tan sistémica ni tan potente, pudiendo considerar

a los pacientes VIH con leishmaniasis cutánea localizada, que ya no presentan lesión, como pacientes curados definitivamente. Esto hace que estos pacientes se comporten como pacientes inmunocompetentes, y de hecho, ese es el perfil de dichos pacientes, que presentan unos niveles de $CD4^+$ muy buenos y una situación de control inmunovirológico de la infección del VIH muy buena. Si esto fuera así, esto querría decir que los pacientes VIH que sólo desarrollan un leishmaniasis cutánea localizada, se comportarían a efectos de los test de respuesta inmunológica SLA como pacientes inmunocompetentes, que una vez "curados" pasan a presentar un test de SLA negativo.

Por otro lado, esta falta de respuesta inmunológica sistémica remarca la dificultad en encontrar un test que defina exposición a Leishmania, ya que de no haber presentado leishmaniasis cutánea estos dos pacientes habrían sido definidos como no expuestos, y permite especular que probablemente el porcentaje de expuestos es aún mayor del estimado en nuestro estudio.

5. Leishmaniasis visceral en los pacientes VIH de nuestra cohorte y comparación con el grupo de pacientes inmunocompetentes y bajo tratamiento inmunosupresor

5.1 Características de los pacientes

Como en la mayoría de estudios y publicaciones sobre pacientes coinfectados, los pacientes de nuestra muestra son sobre todo varones jóvenes (181)(182). Existe un predominio de casos entre los hombres que suponen un 85,7%. La cuestión del género de los pacientes resulta llamativa, ya que en todos los estudios existe siempre un mayor porcentaje de hombres sin que quede clara la razón de esta particularidad. En muchos casos se ha propuesto el hecho de que los hombre realizan más tareas fuera del domicilio(183), sobre todo en artículos donde las poblaciones son de origen africano o

indio, donde claramente los roles de género son más marcados, y efectivamente podría explicar esta diferencia el hecho de que los hombres trabajan fuera y las mujeres en el ámbito doméstico. No obstante, esta explicación parece poco satisfactoria en nuestro entorno. Existen artículos que hablan del rol de las hormonas sexuales a la hora de favorecer o proteger frente a diversas enfermedades parasitarias (184)(185)(186). Según estos hallazgos, los andrógenos y la progesterona tendrían cierta tendencia inmunosupresora, al interaccionar con macrófagos impidiendo la producción de TNF y NO que es imprescindible para la buena respuesta frente a leishmania. Según estos estudios, las hormonas sexuales podrían explicar porque el género masculino presenta cierta susceptibilidad y el género femenino cierta resistencia frente a enfermedades parasitarias en general. Esto quedó demostrado en modelos de hámsteres para especies diferentes a L.*infantum* (187), donde se observó que el hecho de administrar hormonas del sexo contrario modificaba la presentación clínica, empeorando las lesiones en la hembras. Estos datos parecen justificar esta diferencia, pero se necesitan más estudios, sobre todo con L.*infantum* y en países europeos.

Con respecto a la edad, se observa también que se trata de paciente jóvenes, en nuestra cohorte con un rango de edad de entre los 18 y los 64 años. Evidentemente al hablar de coinfección estos datos se explican en parte por la menor esperanza de vida de los pacientes VIH antes de la entrada del TARGA, y en el resto de la literatura, por proceder de países donde la esperanza de vida globalmente es mucho menor que en España.

La vía de adquisición del VIH a través de la inyección de drogas por vía parenteral (ADVP) supuso en la era pre TARGA un factor de riesgo muy importante, y era encontrado como factor de riesgo independiente para el desarrollo de leishmaniasis

visceral (102)(103). Esto fue de una enorme importancia ya que se demostró la existencia de un ciclo alternativo artificial epidémico y antroponótico entre gente que compartía jeringuillas, que en los primeros años llegó suponer un 80% de los coinfectados en Europa. En los años posteriores de 2001 a 2006, se ha visto un reducción del porcentaje que supone la vía ADVP de un 76% entre los años 1990 y 1998 a un 67% entre los años 2001-2006, con un aumento de la vía heterosexual de un 12% a un 23% (103). En nuestra cohorte, existe un 28,6 % de pacientes que han presentado como vía de contagio más probable la ADVP, lo que muestra el descenso global de este tipo práctica en Europa, y el aumento de la transmisión por vía sexual. En nuestros resultados, nosotros no hemos encontrado que la vía de transmisión de VIH tenga ninguna influencia a la hora de favorecer el desarrollo de leishmaniasis visceral.

Con respecto al origen de los pacientes, un 60% no eran españoles, siendo un 40% de ellos de raza negra procedentes del oeste de áfrica (Nigeria y Guinea Ecuatorial). Hubo dos pacientes del este de Europa (Rumania y Polonia) y un paciente peruano. Todos estos pacientes llevaban muchos años viviendo en España, por lo que se presupone que los casos son todos autóctonos. Esto se confirma dado que se trata de la misma especie de L.*infantum* y por la ausencia de casos de leishmaniasis visceral descritos de manera habitual en los países del oeste de áfrica.

Cuando realizamos la comparación de la epidemiología, el cuadro clínico, etc... entre los diferentes grupos (los pacientes inmunocompetentes, los pacientes VIH y los pacientes bajo tratamiento inmunosupresor (anti-TNF, metotrexato, etc…) encontramos diferencias interesantes que merecen la pena ser discutidas.

En primer lugar las poblaciones son parecidas en la distribución de género (con ligera predominancia del masculino), pero sí encontramos una diferencia en la media de

edad, donde la edad de la población bajo tratamiento inmunosupresor es ligeramente mayor (p=0,01) con una media de 56 años frente a una media de unos 42-43 años en los otros dos grupos. No es de esperar, no obstante, que esta diferencia encontrada ejerza una influencia muy importante en la presentación clínica, pruebas diagnósticas, etc… pero hay que tenerla en cuenta.

Otra característica diferencial entre los diferentes grupos fue la mayor presencia de pacientes de raza negra en el grupo de los inmunocompetentes (49.4%) (p=0,02) , frente a los otros dos grupos, un 38.5% en el grupo de los pacientes de VIH y un llamativo 13.3% en el grupo de pacientes bajo tratamiento inmunosupresor. Esto lleva a plantear la hipótesis de que los pacientes de etnia negra u origen sub-sahariano tendrían una especial predisposición a padecer leishmaniasis visceral. No sabemos que factores hacen que en individuos inmunocompetentes la enfermedad se presente como visceral, cutánea o ganglionar. Durante el brote de Fuenlabrada, llamó la atención que sólo un paciente de origen subsahariano presentara leishmaniasis ganglionar (ratio 1:16) (39) y que hayan habido muy pocos casos de leishmaniasis cutánea en esta población(188)(25). En la serie de LV pediátrica publicada en relación con el brote, se muestra una proporción similar de pacientes de raza negra con leishmaniasis visceral, representando en torno al 50%(189) . En este estudio, se propuso que las diferencias podían ser debidas a factores externos ligados a una mayor exposición al exterior, y por lo tanto a los flebotomos, debido a las condiciones de las casas o su localización, pero los estudios epidemiológicos realizados hasta ahora, no han encontrado ninguna diferencia; no hay mayor contacto con perros, no hay presencia de vectores en las casas ni en las zonas adyacentes(25).

Llama la atención que en nuestro estudio hemos encontrado que este grupo de pacientes parecen vivir más cerca del parque, aunque esto no explicaría la ausencia de

formas ganglionares y cutáneas. Como ya hemos mencionado previamente, estas diferencias podrían estar explicadas por diferentes susceptibilidades genéticas entre los pacientes de origen subsahariano y los pacientes españoles nativos, diferencias parecidas se han apuntado ya en otros grupos de estudio(190), aunque se debería realizar más estudios en este sentido para poder afirmarlo.

5.2 Clínica presentada: síntomas, signos y exploración física

Con respecto a la clínica, al igual que en varias publicaciones, el cuadro clínico esencial presentado por nuestros pacientes VIH no difirió de manera esencial del presentado en pacientes inmunocompetentes(103)(191)(192)(193), si bien hemos encontrado algunas diferencias que cabe mencionar. La triada clínica habitual; fiebre, hepatoesplenomegalia y pancitopenia se presentó en una mayoría de los pacientes, sobretodo la esplenomegalia y la pancitopenia que supuso entre un 78-85% de los pacientes. Con respecto a la aparición de fiebre, hubo un porcentaje menor de pacientes que la presentaron (64%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (P=0,001) cuando se comparó el grupo de pacientes inmunocompetentes y pacientes bajo tratamiento inmunosupresor. Esto difiere con la mayoría de la literatura publicada donde se encuentra tasas parecidas de fiebre entre pacientes VIH y pacientes inmunocompetentes. No obstante, de manera clásica, en todos los artículos se menciona la menor tasa de presentación de fiebre como un hecho descrito en varias publicaciones, en pacientes VIH, sobretodo en aquellos pacientes con mayor inmunosupresión (193)(194). Llama la atención que la menor presencia de fiebre en nuestra cohorte se presentó en pacientes donde el diagnóstico de leishmaniasis visceral fue muy tardío, con una media de 164,6 días hasta el diagnóstico, y con un rango de 16 a 420 días. Este retraso en el diagnóstico, lo que evidencia, es que es la fiebre uno de los síntomas guía para la sospecha de una leishmaniasis visceral, y cuando

esta no aparece, es mucho más complicada la sospecha clínica. Es por tanto normal que este síntoma se encuentre siempre en un alto porcentaje, ya que al ser la fiebre uno de los pilares básicos de la sospecha clínica, es su aparición lo que origina el comienzo del estudio. El problema es que en muchos países (sobretodo países sin grandes medios económicos ni buenos sistemas de salud) en ausencia de este síntoma puede que haya gente que nunca accede a otras pruebas, o que no acaba siendo diagnosticada, mientras que en nuestro hospital, se puede dar el caso de que el diagnóstico de leishmaniasis se produzca en el seno de la investigación de un cuadro de astenia y pérdida de peso, o el estudio de una pancitopenia a la cual se le realiza un aspirado de médula ósea, o por ejemplo, como en el caso de uno de nuestros pacientes, que sea diagnosticado por biopsia hepática dentro de un estudio de elevación persistente de transaminasas sin causa aparente, en un paciente completamente asintomático y sin fiebre.

Por otro lado, esta forma de presentación menos llamativa sería reflejo de la coexistencia de Leishmania y VIH en pacientes bajo tratamiento con TARGA que consiguen controlar parcialmente el virus pero no mejorar sustancialmente su status inmunológico; mientras que las formas de presentación clásicamente descritas, virulentas y agresivas, son propias de pacientes muy inmunodeprimidos sin TARGA, como ocurre en países del tercer mundo o en las series de la era preTARGA.

Es interesante resaltar que en nuestra cohorte, los porcentajes de los diferentes síntomas presentados no son tan llamativos como en otras series. La astenia y la pérdida de peso se presentaron en un 35% de los pacientes, y hubo un porcentaje alto de pacientes que referían dolor torácico (23%) que rozó la significación estadística en comparación con los otros grupos (p=0,057) y tos en un 29% de los pacientes.

Por lo tanto, el cuadro clínico habitual era un paciente con malestar general y fiebre

en los que al realizar una analítica, se objetivaba una pancitopenia.

En cuanto a la exploración física, existió un 78% de los pacientes VIH con esplenomegalia en prueba de imagen que son porcentajes similares a los descritos en la literatura y que son porcentajes ligeramente más bajos que en inmunocompetentes (192)(193). En el grupo de inmunocompetentes se detectó esplenomegalia en un 96% y en un 85% de los pacientes bajo tratamiento inmunosupresor, siendo la diferencia estadísticamente significativa (P= 0.032). De manera esperable, la detección de esplenomegalia sólo mediante exploración física bajaba a unos porcentajes entorno a un 30-46% siendo aparentemente más fácil detectar la esplenomegalia en pacientes VIH.

5.3 Pruebas analíticas: Alteraciones hematológicas, velocidad de sedimentación, ferritina y proteína C reactiva.

A nivel analítico, los hallazgos encontrados habitualmente son una parte muy importante del cuadro y un pilar fundamental para la sospecha clínica. En los pacientes VIH es muy habitual encontrar alteraciones hematológicas secundarias al propio VIH, a los tratamientos utilizados, etc…

En nuestros pacientes la alteración analítica más frecuentemente encontrada fue la trombopenia y la leucopenia. Como hay descritos en otros estudios la leucopenia es una leucopenia moderada y en nuestro caso con una media de 2,435 10^3 /µ, lo que concuerda con resultados de otras series (133), y en el caso de la trombopenia, esta es ligeramente más acusada con una media de 105, 928 10^3 /µ. En cuanto a la anemia, la mayoría de los pacientes presentaban valores menores de 10 gr/dl.

Al comparar estos hallazgos entre los diferentes grupos, se encuentran algunas diferencias. El grupo de pacientes en tratamiento inmunosupresor se encuentran niveles medios más bajos de anemia y trombopenia, siendo estas diferencias estadísticamente

significativas con ANOVA (P respectivas de p=0.014 y 0.009). La media de hemoglobina en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor fue de 8,9 gr/dl frente a una media en los otros dos grupos de 10 gr/dl aproximadamente. También presentaron una menor media de plaquetas, que fue de 69333 10^{3}/μl frente a 850,000 10^{3}/μ y 115,00010 ^{3}/μ en los otros dos grupos. Estas diferencias resultan llamativas. No podemos comparar con otras series ya que no hay publicadas series que comparen estos tres tipos de pacientes, pero podemos pensar que puede estar influenciado por sus propias enfermedades de base (enfermedades autoinmunes) que en muchas ocasiones presenta ellas mismas citopenias ligadas a esas enfermedades. Otra posibilidad es que sea también fruto de los efectos de los tratamientos inmunosupresores que en ocasiones también tienen estos efectos sobre las series hematológicas, como por ejemplo el metotrexate. No obstante, hacen falta más estudios en este sentido.

Comparando los pacientes VIH con los otros dos grupos se objetiva también que estos dos últimos presentan porcentajes más altos de presentación de anemia, trombopenia y leucopenia, lo cual contrastaría con ciertas series donde se describe lo contrario (192), aunque este hecho puede estar explicado porque son estudios en la década los 90’ y los pacientes que describen son pacientes con una inmunodepresión muy profunda y con VIH en muchos casos no bien controlado.

De los parámetros analíticos realizados, hay tres parámetros llamativos que voy a desarrollar a continuación.

Un parámetro muy interesante que ha presentado niveles muy elevados en los pacientes inmunocompetentes y bajo tratamiento inmunosupresor fue la ferritina. En el inicio del brote, se comenzó a ver que los niveles de ferritina eran especialmente elevados en los pacientes que terminaban por ser diagnosticados de leishmaniasis visceral. Estos

niveles tan elevados, nos llamaron la atención, ya que hay muy pocas enfermedades que eleven los niveles de esta manera. Hasta en un 76% de estos pacientes se presentó con niveles muy elevados por encima de 1000 mg/mL, mientras que en pacientes VIH no se ha elevado prácticamente (P=0.001), salvo en un caso de un paciente con cirrosis. Buscando en la literatura, solo existen ciertos artículos publicados en población pediátrica donde se habla del síndrome hemofagocítico secundario a leishmania (189).

Existe un artículo que demostró niveles altos de ferritina en perros infectados con leishmania, que tras el tratamiento normalizaban los niveles (195) y un case-report del año 1991 (196) donde se exponía un caso de leishmaniasis visceral importado en Alemania donde se objetivó una evolución parecida de los niveles de ferritina y recomendaban que se realizaran estudios para establecer el valor predictor de la ferritina como indicador del éxito del tratamiento (ver figura 39). Basado en la evolución de los parámetros analíticos, que como muestra el gráfico del artículo que se puede ver a continuación, muestra que los niveles de ferritina bajan rápidamente tras el tratamiento frente al resto de series como ya sabemos tardan semanas o meses en recuperarse.

Tras observar dichos hallazgos, sería interesante solicitar la ferritina en casos de sospecha de leishmaniasis visceral y profundizar en si puede, efectivamente, ser un marcador de recuperación. Parece que en pacientes VIH este parámetro no sería de utilidad, ya que como hemos visto, los pacientes VIH no elevan los niveles de ferritina, al menos, no en la coinfección con leishmania, de hecho tampoco presentan elevación de los niveles de proteína C reactiva ni velocidad de sedimentación de los que vamos a hablar a continuación, lo que sugiere que es posible que los pacientes VIH debido a su situación de inmunodepresión no sean capaces de elevar reactantes de fase aguda de manera parecida a los pacientes inmunocompetentes o a los pacientes con una inmunodepresión diferente.

Figura 39. Extraído del artículo de Held TK et al; Ferritin as the earliest prognostic marker in a case of visceral leishmaniasis. J Infect. 1991.

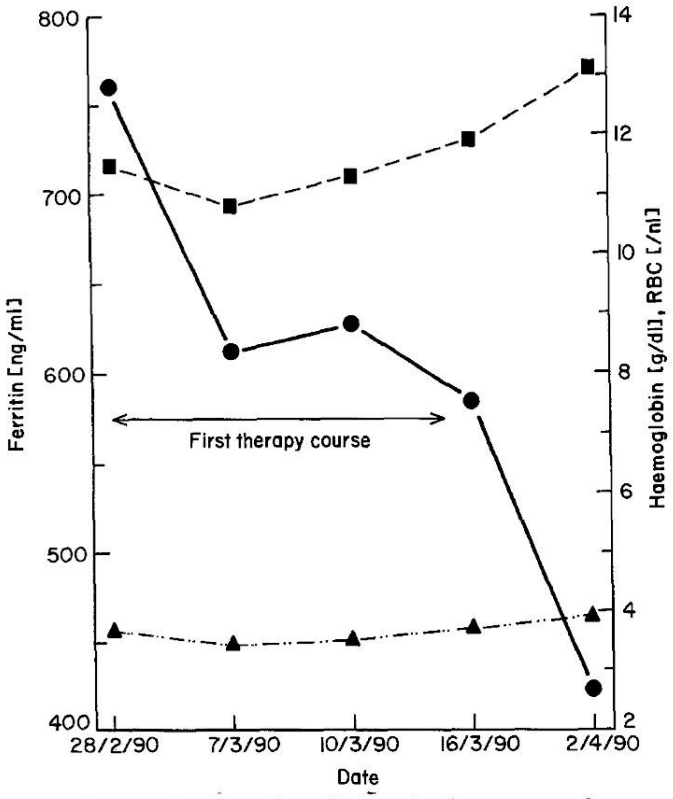


Fig. 1. Rapid fall of serum ferritin values during the first course of treatment in a case of visceral leishmaniasis. Haemoglobin and RBC counts remained abnormal. (Normal values: ferritin 10–200 ng/ml, haemoglobin 12–16 g/dl, RBCs 4·2–5·4/ × 10^{12}/l.) (—●—), Ferritin; (--■--), haemoglobin; (—▲-··-), RBC.

En el caso de la proteína C reactiva, los resultados se asemejan a los de la ferritina pero con diferencias de menor magnitud. Entre los pacientes con VIH sólo encontramos un 55% de los pacientes con PCR > 20 mg/l, frente a un 96% de los pacientes inmunocompetentes y frente a un 79% de los pacientes bajo tratamiento inmunosupresor (diferencia estadísticamente significativa con P<0.001). Con respecto a los resultados de la velocidad de sedimentación presentan resultados más parecidos entre los grupos, y están limitados por que se realizaron en un número menor de pacientes.

5.4 Pruebas diagnósticas

5.4.1. Cultivo y visualización de parásitos en médula ósea:

En nuestra cohorte, se realizaron estudios parasitológicos en todos los pacientes, realizando aspirado de médula ósea para confirmar el diagnóstico y comenzar el tratamiento.

La visualización de parásitos en el aspirado de médula ósea fue baja en todos los grupos de pacientes, con una sensibilidad global de un 42%. En el grupo de pacientes VIH fue en el que más se detectaron los parásitos (63%), lo cual puede ser explicado por una teórica mayor parasitación que en pacientes inmunocompetentes por una incapacidad mayor para el control de la enfermedad. Si comparamos estos resultados con otras series en pacientes con VIH, vemos que estamos más o menos en el mismo rango de positividad (103). En pacientes bajo tratamiento inmunosupresor en un 53% de los casos se visualizaron leishmanias. No obstante, las diferencias entre los grupos no alcanzaron significación estadística.

El cultivo de médula ósea, aunque sólo se realizó en 4 pacientes, fue positivo en todos los casos, lo cual muestra una diferencia estadísticamente significativa (p=0.027) frente a los otros dos grupos donde los porcentajes de positividad son mucho más bajos, 19% para los inmunocompetentes y 38% para los pacientes inmunosuprimidos, si bien es cierto que el cultivo de médula ósea se realizó en un número menor de pacientes. Estos datos concuerda con otras series donde se habla de una sensibilidad de entre un 50-100%(193)(197) y podría estar en relación con una mayor carga parasitaria en pacientes inmunodeprimidos.

Como reflexión final, me gustaría destacar que la realización del cultivo es una técnica difícil que precisa de laboratorios con un equipamiento caro y precisa de personal muy cualificado y con mucha experiencia, lo que limita mucho estas técnicas en áreas endémicas y con pobres recursos económicos. Además, salvo la extracción sanguínea, la extracción de material para cultivar (médula ósea, pero también hay estudios con tejido esplénico, ganglionar, etc…) supone maniobras muy agresivas y dolorosas para el paciente. Esto supone una limitación en pacientes VIH donde las recaídas son frecuentes, y en los que se tienden a realizar a lo largo de los años múltiples técnicas diagnósticas para descartar recaídas ante cuadros de fiebre, pérdida de peso, etc… Por lo tanto, para estos pacientes es muy importante la posibilidad de encontrar técnicas diagnósticas fiables, y sobre todo poco invasivas.

5.4.2. Técnicas serológicas:

Dentro de las técnicas serológicas, nos encontramos con la realización de varias técnicas diferentes, y con diferentes dificultades a nivel técnico. Como ya se ha mencionado previamente, en pacientes VIH, es precisa la realización de mínimo dos pruebas serológicas, ya que presentan de manera muy frecuente resultados negativos debido a la incapacidad para generar un buen nivel de anticuerpos contra leishmania. De esta manera, al combinar dos técnicas serológicas, se aumenta la sensibilidad a la hora de poder diagnosticar a un paciente VIH.

Dentro de estas técnicas para detectar anticuerpos, las técnicas validadas por la OMS son la determinación de antígeno rK39, que es una técnica rápida, el ELISA y la Inmunofluorescencia indirecta (IFAT)(198). En todos nuestros pacientes se realizaron dos técnicas: el rK39 y o bien IFAT o bien ELISA.

En nuestra cohorte de VIH, el 100% de los pacientes en los que luego se confirmó

leishmaniasis visceral el IFI/ELISA fue positiva, lo que supondría un valor predictivo negativo del 100%. Sólo en un caso sospechoso con ELISA positivo no se confirmó el diagnóstico, lo que estimaría una especificidad del 93%, que bajó al 89% al incluir todos los pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos. Es decir, tendríamos una prueba altamente sensible, y se podría concluir que ante un caso sospechoso de leishmaniasis visceral, en caso de que el IFI o el ELISA sea negativo se puede descartar esta posibilidad. Esto difiere con los estudios realizados en pacientes VIH (123) (193) (199), realizados mayoritariamente en la era preTARGA, donde se describía una alta proporción de seronegativos, en el contexto de una inmunodepresión humoral muy severa que no se corresponde con la realidad actual de la mayoría de los pacientes VIH de nuestro medio.

Por otra parte, el test rápido rK39 presenta una sensibilidad baja y sin diferencias entre los grupos; VIH 56%, inmunocompetentes 44% y pacientes en tratamiento inmunosupresor 64%, pero con un valor predictivo positivo del 100%, siendo una técnica sencilla, estandarizada y rápida, que permitiría confirmar el diagnóstico, en caso de ser positiva, en menos de dos horas. Por el contrario, un valor negativo no permitiría descartar leishmaniasis.

Por tanto, con la combinación de ambas técnicas serológicas se puede confirmar la presencia de leishmaniasis visceral en VIH si el rK39 es positivo y descartarla si el ELISA/IFAT es negativo.

5.4.3 Técnicas de detección ADN:

Las técnicas existentes para detectar ADN de los parásitos en distintos medios ha demostrado muy buenas sensibilidades en la literatura (54)(153)(200). Presenta varias ventajas, como la posibilidad de su realización en diferentes tejidos e incluso en sangre periférica, lo que permite disminuir la invasividad de las pruebas diagnósticas. La

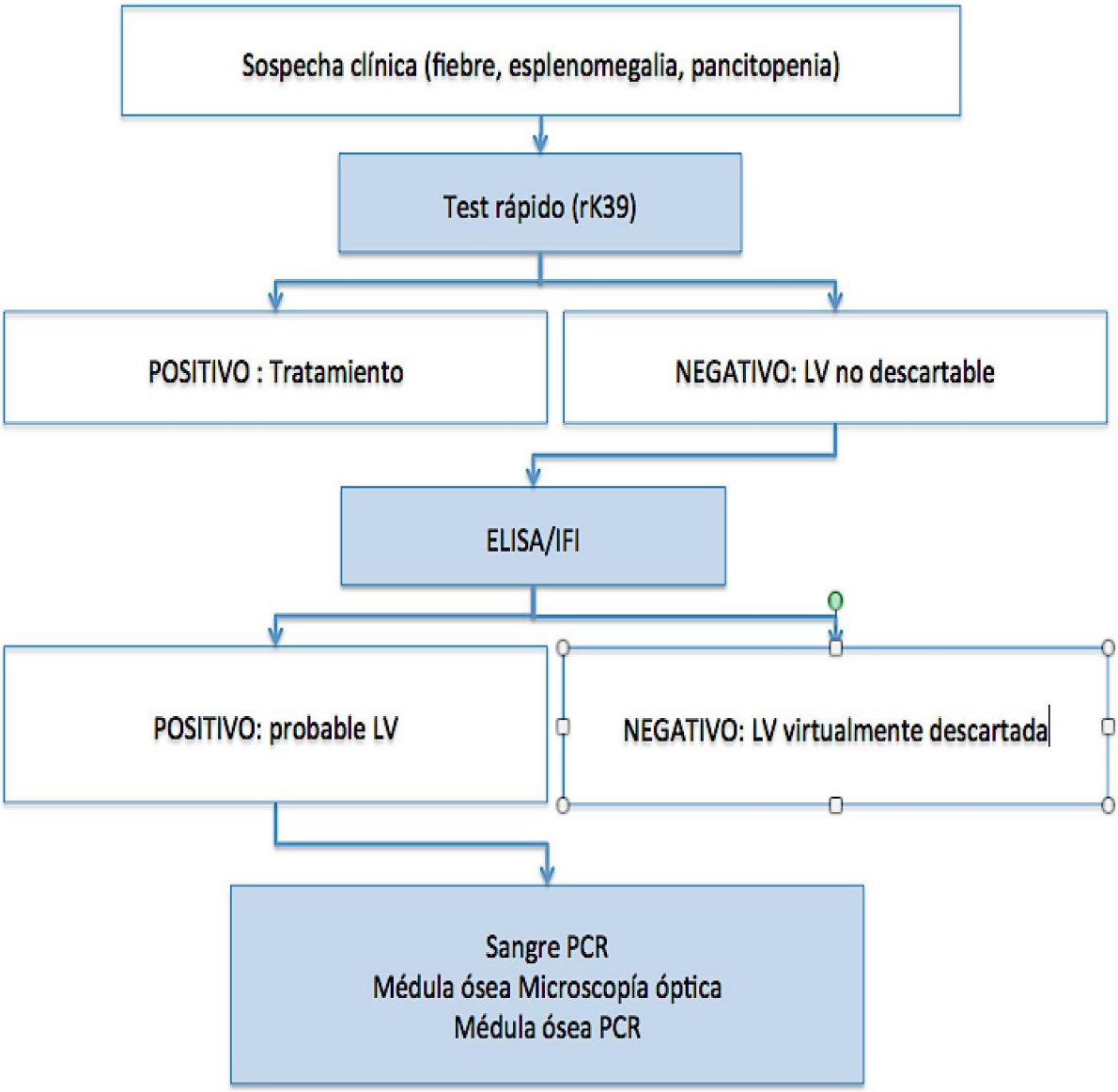
aparición de la PCR cuantitativa, también ha abierto nuevas vías de investigación basadas en la posible detección temprana de una recidiva al comprobarse un aumento progresivo antes de desarrollar la enfermedad. No obstante, ha demostrado resultados variables y se precisan más estudios. Además La PCR cuantitativa, puede realizarse en sangre periférica, y permite no realizar pruebas invasivas en pacientes, sobre todo ante sospechas de una recidiva. El problema principal se centra en cómo realizar un manejo clínico de un paciente VIH con PCR positiva, y que se encuentra asintomático, ya que los tratamientos presentan un alto coste y una alta tasa de efectos secundarios.

En nuestro hospital esta técnica no estaba disponible en los primeros años del brote y sólo fue solicitada en tres pacientes, siendo positiva en los tres casos. En los otros grupos mostró sensibilidades de un 64% para pacientes inmunocompetentes y un 70% en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor.

La PCR en médula ósea está considerada el gold standard del diagnóstico de leishmaniasis visceral, mostrando en nuestra serie de VIH buenos resultados, con una sensibilidad del 80% en pacientes VIH y 93% y 100% en el resto de grupos, sin diferencias entre los grupos que fueran estadísticamente significativas, en concordancia con la literatura.

Propuesta de diagnóstico

Teniendo en cuenta todos estos datos, con los datos de valor predictivo positivo del test rápido y el resto de sensibilidades, nuestra propuesta de estrategia diagnóstica para los pacientes VIH no sería diferente de la del resto de pacientes y se muestra a continuación:



Por lo tanto, ante la presencia de un cuadro clínico compatible, frente a un test rápido rK39 positivo podríamos comenzar tratamiento si el paciente está inestable. Si el test rK39 es negativo, y el ELISA o el IFAT son negativos, virtualmente se descarta leishmaniasis visceral. Si la serología convencional (ELISA/IFAT) es positiva, y dado que el ELISA puede dar falsos positivos en nuestra experiencia, se debería solicitar PCR en sangre y/o aspirado de médula ósea para visualización y PCR para confirmar el diagnóstico, en función de disponibilidad, siendo en nuestra serie y en la literatura la sensibilidad de la PCR en médula algo superior a la de sangre. También, y dado que es una técnica más invasiva, se puede reservar el aspirado de médula para aquellos pacientes con alta sospecha clínica, ELISA positivo y PCR en sangre negativa.

5.5 Tratamientos, recaídas y efectos secundarios

El tratamiento recibido por nuestros pacientes, fue realizado principalmente con anfotericina B liposomal. La dosis media de tratamiento fueron unos 41,4 mg/ kg, que es una dosis media más alta que los que recibieron los pacientes inmunocompetentes (dosis de entre 15-30 mg/kg). Hubo dos pacientes que recibieron unas dosis más bajas (22 y 21 mg/kg), de estos pacientes uno recidivó porque dejó el tratamiento y la profilaxis, y el otro mantuvo profilaxis secundaria adecuadamente.

No existen muchos estudios realizados con Anfotericina B liposomal en casos de coinfección (201)(136) y no hay claro consenso sobre las dosis que hay que administrar, no obstante, en el último comité sobre leishmaniasis de la WHO en Ginebra en 2010 se recomendaban para el tratamiento de pacientes con coinfección Leishmania/ VIH, dosis de 3-5 mg/kg al día o de forma intermitente en 10 dosis (días 1–5, 10, 17, 24, 31 and 38) hasta una dosis de 30-40 mg/kg.

De nuestros pacientes, 4 pacientes recidivaron, dos de ellos porque habían

abandonado la profilaxis, y todos fueron retratados con anfotericina B liposomal. Así que podríamos asumir un fracaso al tratamiento del 14%, ligeramente más bajo que en algunos estudios (20-22%) aunque es muy variable con tasas descritas de hasta 60%(202). Además, hay que tener en cuenta que estas son tasas globales en todo el mundo, y que pueden variar según los países. La media de tiempo hasta la recidiva/ fracaso, fue de 103 días con un rango amplio que va desde los 30-227 días, lo que concuerda con todos los estudios realizados donde se observa un mayor riesgo de recidiva entre el primer y séptimo mes tras el tratamiento. De nuestros pacientes, 11 han recibido profilaxis secundaria, y de estos, un 27,3% la han realizado con antimoniales, y el resto con dosis mensuales de anfotericina B liposomal.

Como ya se mencionó en el apartado de resultados, existen 3 pacientes con una evolución particular, que merecen mención a parte dada su evolución.

En el paciente primer paciente mencionado (descripción de resultados en páginas 120-123) que se diagnostico a raíz de una biopsia hepática se observaba una PCR positiva y respuesta celular linfoproliferativa negativa reiteradas. Este paciente presenta un riesgo muy alto de recidiva ya que no ha conseguido desarrollar una buena respuesta inmune, y se mantiene en profilaxis. En este caso, podemos pensar que en este paciente, parece que la profilaxis evita el desarrollo de leishmaniasis visceral. Esta situación evidencia lo que ya se ha comentado previamente, que es la dificultad de manejo de pacientes que estando asintomáticos presentan PCR positivas. En esta situación el test de SLA podría ayudarnos a tomar una decisión con mayor facilidad.

El segundo paciente que se comenta, evidentemente también es un paciente con alto riesgo de recidiva, por el mal control del VIH y el abandono de todo tratamiento. En cuanto presentaba abandono de la profilaxis desarrollaba un nuevo episodio de

leishmaniasis visceral. Es el ejemplo de los pacientes con mala situación inmunológica que no pueden nunca considerarse curados, y que precisan profilaxis secundaria hasta que desarrollan una buena repuesta inmune y una buena adherencia al tratamiento.

El último caso (resultados en páginas 120-123), se trata de un paciente que representa el paradigma del paciente coinfectado. Este paciente ha presentado leishmaniasis visceral recidivante con hasta 6 episodios hasta la fecha. En este tipo de pacientes, los tratamientos no son tan eficaces como en pacientes inmunocompetentes, produciéndose múltiples recaídas, abundantes efectos secundarios que obligan a cambiar tratamiento y profilaxis, y en los que el clínico acaba sin claras opciones, y ha de probar pautas que no se han probado en amplios estudios si no en experiencias de casos publicados(203).

Como efectos secundarios que hemos detectado durante el tratamiento de los pacientes, no hemos encontrado ningún efecto adverso no notificado. Prácticamente todos los pacientes referían malestar durante la infusión de anfotericina B y dolor a nivel lumbar (204)(205)(206) que cedía con la infusión más lenta del fármaco. El 50% de los pacientes desarrollaron insuficiencia renal aguda que no precisó cambiar el fármaco, salvo en un paciente que presentaba previamente enfermedad renal previa y que desarrolló un reacción alérgica importante durante la administración. Como ya se ha detallado en los resultados todos los pacientes presentaron elevación de sus creatininas basales y a cuyos niveles volvieron tras la finalización del tratamiento.

En cuanto al resto de medicaciones, los antimoniales, no hemos tenido efectos secundarios graves, si bien, no ha sido un tratamiento ampliamente utilizado y es mejor tolerado como profilaxis, no obstante no hemos tenido ningún caso grave de los descritos en la literatura (pancreatitis, leucopenia, fallo renal…)(135). En el caso de la miltefosina

que intentó un paciente, fue retirada por náuseas y diarrea importante. Estos efectos adversos están descritos en un 10-25% de los pacientes, y no suelen requerir la retirada del fármaco(207)(208), siendo considerado en general un fármaco bien tolerado. Evidentemente, al ser sólo un paciente no se pueden extraer grandes conclusiones sobre su utilización. Por último la utilización de paramomicina tuvo que ser retirada por el intenso dolor de la administración de la inyecciones, que se cifra en la literatura en un 50-55% de los pacientes, aun así se considera a nivel global como un tratamiento seguro y barato, y normalmente no precisa ser retirado por sus efectos secundarios (82) (86)(98)(114).

6 ***Factores predictores de recaída y marcadores de enfermedad: el papel de la respuesta linfoproliferativa tras estimulación con antígeno de leishmania (SLA) como predictor de recaída de leishmaniasis visceral en pacientes VIH.***

Como se ha mencionado, la introducción de la TARGA para el tratamiento del VIH supuso una disminución en los casos de coinfección Leishmania/HIV, estando este hecho asociado a un aumento de los niveles de CD4+ producidos por este tratamiento.

La combinación de TARGA y profilaxis secundaria han conseguido disminuir mucho la incidencia de casos de leishmaniasis visceral en pacientes VIH(209). Aun así, el número de recaídas se mantiene muy alto en pacientes que están recibiendo TARGA y profilaxis, sobre todo en aquellos que a pesar de tratamiento mantienen niveles bajos de $CD4^{+}$. Clásicamente los niveles < 200-250 cel/ µl ha sido el parámetro relacionado con el riesgo de acabar desarrollando un episodio primario de leishmaniasis visceral y el umbral bajo el cual se cree, existe un mayor riesgo para presentar recaídas (210). Por lo tanto, tradicionalmente se han utilizado estos niveles para decidir si un paciente debería o no realizar una profilaxis secundaria(103)(6)(211) (212).

Una particularidad de la leishmaniasis que no presentan otras enfermedades oportunistas es que puede presentarse con niveles de $CD4^+$ superiores a 200 cel/µl(213)(152). Existe evidencia de que otros factores diferentes de los niveles de $CD4^+$ están implicados en la susceptibilidad de padecer un primer episodio de leishmaniasis visceral en pacientes VIH y también en el hecho de presentar o no recaídas (212).

A parte del estatus de inmunosupresión que es expresado con niveles bajos de $CD4^+$, uno de los objetivos de esta tesis fue intentar confirmar si la respuesta linfoproliferativa frente a L. infantum (medida mediante SLA) era una herramienta eficaz para establecer si se han conseguido generar un células T memoria específicas para L. infantum, capaces de mantener la infección parasitaria bajo control, de esta manera evitar recaídas, y en consecuencia, retirar la profilaxis secundaria a estos pacientes, independientemente de sus niveles de CD4+.

Durante el seguimiento de nuestros pacientes VIH coinfectados, hemos visto que 6 de los 10 pacientes presentan una respuesta linfoproliferativa a SLA positiva. Todos estos pacientes se han mantenido sin profilaxis durante más de 60 semanas, y no han presentado ninguna recaída (Figura 34, en el apartado de resultados). Los otros cuatro pacientes en seguimiento que presentaron una respuesta linfoproliferativa negativa a SLA, son los tres pacientes recidivantes, comentados previamente, y un cuarto que ha permanecido asintomático con PCR negativa y SLA negativo (Figura 34) .

Estos resultados, aunque están limitados por el pequeño número de la muestra, apoyan la teoría de que la positividad del test de linfoproliferación frente a SLA es indicativa de un buen desarrollo de respuesta inmune celular protectora contra el parásito. Este hecho hace que pueda tratarse de un buen marcador que indique que no hay riesgo de recaída y que se puede retirar la profilaxis en estos pacientes, sin riesgo a que presenten una nueva recaída.

Todos los pacientes en nuestra cohorte que presentaron una respuesta linfoproliferativa negativa a SLA tenían menos de 200 CD4+, no obstante, observamos que dos de los seis pacientes con respuesta linfopoliferativa positiva tenían menos de 200 $CD4^+$ cuando se les retiró la profilaxis y que 4 de estos 6 pacientes que están sin profilaxis en el momento actual tienen menos de 350 CD4+.

Si nos acordamos de las Figuras 35 y 36 en el apartado de resultados, parece muy evidente la diferencia en el índice de estimulación (SI) con el test de SLA entre grupo de pacientes "curados" frente al grupo de pacientes enfermos o que continúan en profilaxis. Los pacientes que han sido tratados, y que están curados, presentan unos índices de estimulación de entre 6,0 y 8,0. Esto indicaría que estos pacientes han sido capaces de construir una respuesta celular adecuada y protectora frente a leishmania infantum, incluso en aquellos pacientes con $CD4^+$ por debajo de 200 cel/ µl. Esto reforzaría la teoría de la importancia de que los $CD4^+$ puedan generar una respuesta eficaz a pesar de que su número sea pequeño, primando más la funcionalidad específica de estos $CD4^+$ frente a una patógeno concreto que su número total.

Actualmente las recomendaciones existentes nos dicen que hay que utilizar los niveles de CD4+ para valorar mantener o retirar la profilaxis secundaria, aún que realmente, no hay una clara evidencia para esta recomendación (6)(211). Estudios previos demuestran que es muy importante mantener unos buenos niveles de $CD4^+$ y que el hecho de desarrollar una respuesta específica inmune celular contra leishmania tras el tratamiento es vital para disminuir el número de recaídas (214)(158).

Es reconocido el hecho de que la coinfección tiene un efecto sinérgico que facilita el aumento de la carga viral del VIH y la progresión a SIDA y por otro lado, favorece la multiplicación incontrolada de parásitos (215). Finalmente, esto reduce la capacidad del

TARGA para poder aumentar el número de $CD4^+$. Además, existe una interacción específica entre leishmania y HIV a nivel celular que afecta principalmente a los macrófagos y células dendríticas, que resultar en la incapacidad de generar una respuesta inmune celular correcta. En consecuencia, en pacientes coinfectados, la especificidad de la respuesta inmunes no solo depende del número de $CD4^+$, la "funcionalidad" y la capacidad de actividad de estas células (que es valorada por el test de SLA) debería tenerse encuentra.

Un parámetro analítico que ha demostrado resultados esperanzadores de cara al manejo de pacientes coinfectados es la determinación cuantitativa de la carga parasitaria mediante PCR. Existen varios estudios que han utilizado la PCR en tiempo real, en sangre periférica, para demostrar que las recaídas vienen precedidas por una elevación de los niveles de parásitos medidos mediante esta técnica (200)(153)(55). Todavía no se sabe cada cuanto tiempo deberían realizarse estas pruebas ni qué niveles están claramente asociados a una recaída.

En nuestra cohorte, encontramos 3 pacientes con PCR positiva, de los cuales dos eran los pacientes que habían recaído. El tercer paciente estaba asintomático, pero curiosamente, presentaba una carga parasitaria mucho mayor que la del resto de pacientes que habían presentado recaídas clínicas. Todos ellos presentaron un test de linfoproliferación para SLA negativo. Ambos resultados (la PCR y el test de SLA) no presentaron ninguna variación a lo largo del estudio con periodos de seguimiento de entre 55 y 115 semanas. Este hecho refuerza nuestra teoría, y demuestra una relación consistente entre los resultados de positividad de PCR y la negatividad de test de linfoproliferación a SLA. Es posible que estas dos técnicas puedan ser utilizadas de manera

complementaria en el seguimiento de pacientes coinfectados tras la retirada de la profilaxis secundaria.

En definitiva, la utilización de esta técnica permitiría retirar la profilaxis en aquellos pacientes con < 200 CD4+ de manera segura y disminuiría la administración de tratamiento que tienen muchos efectos secundarios, que son caros, y que han demostrado ser insuficientes para prevenir recaídas.

6.1 Propuesta de seguimiento de pacientes VIH basado en test SLA

Después de observar la evolución de los pacientes, y nuestras experiencias, nuestra propuesta de manejo y seguimiento seria el siguiente.

Tras el diagnóstico de una leishmaniasis visceral, el paciente sería tratado con el esquema habitual recomendado para estos pacientes, de 30-40mg de anfotericina B liposomal como recomienda la OMS (198).

Tras finalizar el tratamiento se valorara si el paciente está clínicamente asintomático, y se realiza un test analítico que incluya PCR para Leishmania en sangre y un test de linfoproliferación a SLA. Si la PCR es negativa y el SLA es positivo, el paciente se considera en bajo riesgo de recaída y NO SERIA PRECISO realizar profilaxis mensual, siempre que el paciente realice un TARGA adecuado que consiga control virológico.

Estos test serían repetidos cada 3 meses durante al menos un año, que es el período de mayor riesgo de recaída. Si en los sucesivos test el SLA se mantuviera positivo y la PCR negativa, el paciente podría considerarse curado. En caso contrario, el riesgo de recaída sería alto y habría que valorar retratamiento en función de síntomas clínicos.

Si tras el tratamiento, el test SLA fuera negativo, la recomendación sería iniciar profilaxis mensual y mantenerla hasta que este test se positivizara, realizando el test cada 3 meses. En mi opinión, el paciente de mayor dificultad es aquel paciente asintomático con

SLA negativa y PCR negativa, en el que podría ser de utilidad valorar otros test inmunológicos que ayudaran a predecir el riesgo de recidiva.

6.2 Comparación de la respuesta linfoproliferativa tras estimulación con antígeno de leishmania (SLA) entre los diferentes grupos.

Cuando comparamos las respuestas celulares entre los diferentes grupos, podemos comprobar que existen diferencias interesantes.

Se puede ver en las figuras del apartado de resultados (Figuras 28 y 29), que cuando se compara el índice de estimulación (SI) entre los grupos de pacientes curados y pacientes enfermos de todos los grupos juntos (excluyendo la forma ganglionar), se pude ver que hay una clara diferencia entre los pacientes curados que presentan SI entre 4,00 y 7,00 y los pacientes enfermos, cuyos SI no llegan a 2,00.

Cuando se divide por grupos, podemos observar que los niveles medios del índice de estimulación son diferentes (Figuras 28 y 29).

En el grupo de pacientes inmunocompetentes, la media del SI antes del tratamiento es de 1,5 (IC 95% 1,17- 1,8), frente al 0,97 (IC 95% 0,8- 1,1) de los pacientes VIH y un 2,3 (IC 95% 0,5- 4,0) de los pacientes bajo tratamiento inmunosupresor. Estas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas, aunque claramente muestran una tendencia (p= 0.08). Esto es debido, probablemente, al número bajo de muestras para SLA en el grupo de pacientes VIH enfermos, ya que estas pruebas se comenzaron a realizar cuando en algunos casos los pacientes ya estaban en tratamiento, y esto limita la cantidad de test de realizados en pacientes VIH en el momento de enfermar previo al tratamiento. No obstante, los resultados que tenemos son muy consistentes. En pacientes bajo tratamiento inmunosupresor, la respuesta linfoproliferativa es mucho más variable, y su comportamiento es menos predecible. Esto probablemente se deba a que las propias

enfermedades que requieren tratamiento con inmunosupresores son de carácter autoinmune, lo que explica que en muchas ocasiones veamos valores de linfoproliferación incluso más altos que en pacientes inmunocompetentes.

Cuando comparamos estos valores con los valores tras el tratamiento, se puede observar un aumento de la linfoproliferación muy importante, con valores que incluso duplican los resultados previos al tratamiento. En pacientes inmunocompetentes tenemos una media de 4,7 (IC 95% 3,9-5,6), en pacientes VIH una media de 7,0 (IC 95% 4,5-9,5) y en pacientes bajo tratamiento inmunosupresor, unos valores parecidos a los pacientes inmunocompetentes, con media de 4.8 (IC 95% 3,7-5,8).

Especialmente interesante resulta el caso de la linfoproliferación espectacular de los pacientes VIH. Para este hecho, no tenemos una respuesta clara. Podría tratarse de una sobrerreacción del sistema inmune una vez controlada la infección, o podría indicar que en estos pacientes persisten parásitos que precisan de esa reacción inmune para mantener controlada la infección, lo que implicaría a su vez, que los pacientes VIH no llegan a curarse, si no que mantienen a los parásitos controlados. Sería un paradigma similar a la tuberculosis.

7. Factores de riesgo para la exposición a L. infantum durante el brote

Uno de los aspectos que nos interesaba mucho estudiar durante este brote, era comprobar si existían factores de riesgo para la exposición al parásito durante este brote.

Analizamos múltiples variables ligadas a las características de los pacientes que como era de esperar no salieron relacionadas. Cuando se miden los factores de riesgo para estar expuesto al parásito, lo lógico es que sean variables ambientales, como el tipo de casa, los hábitos de los pacientes, que nosotros no tuvimos la posibilidad de estudiar.

Un valor que salió estadísticamente significativo ($p=0.046$) fue el nadir de $CD4^+$ durante el brote. Los pacientes NO expuestos, presentaron una media de nadir de $CD4^+$ de 267 cels/µl, frente a una media de 193 cels/µl de los pacientes que estuvieron expuestos. Esta diferencia es difícil de explicar, dado que la exposición depende más de factores ligados a estar en la presencia del flebotomo y de ser picado, que en principio de características propias de la inmunología de los diferentes individuos. Es posible que esto refleje las dificultades para encontrar un test válido que defina exposición. Los pacientes asintomáticos con mejor inmunidad, como ocurre con los pacientes con leishmaniasis cutánea, sería menos probable que desarrollaran respuesta sistémica (SLA positivo) ya que eliminarían el parásito en piel. Como ya comentamos, es probable que nuestros resultados de la exposición estén infraestimados, ya que las técnicas de las que disponemos, siendo las mejores posibles, no detecten a todos los expuestos.

Cuando se acude a la literatura para comprobar cuáles son los factores ligados a una mayor transmisión/ exposición frente a leishmania, nos encontramos con un conjunto de condiciones que o bien afectan al medio en el que habitan los pacientes, o son factores asociados a la vulnerabilidad de la población (que a su vez puede estar íntimamente ligado al

punto previo) o ligadas al aumento del vector (216) en una zona determinada.

Evidentemente, en el brote acontecido en Fuenlabrada, se dan las condiciones idóneas para un brote: se objetiva un aumento del vector (flebotomo), existe un alto número de animales que actúan como reservorio, que en este caso son las liebres (además en ausencia de depredadores) y la cercanía de un núcleo importante de población.

Casi todos los estudios hablan de dos factores que están favoreciendo mucho el aumento de casos de leishmaniasis, y su extensión a zonas donde previamente no existía leishmania; el cambio climático y los cambios demográficos y urbanísticos.

El cambio climático se ha ligado a este fenómeno, ya que el aumento de temperatura, permite en este caso, que los flebotomos puedan sobrevivir más al norte de Europa en latitudes y altitudes más altas (se han encontrado hasta en Alemania) y puedan picar durante más meses al año, cambiando su hábito. Incluso hay hipótesis que sugieren que si persiste un aumento progresivo de la temperatura y aumento de la desertización, podrían desaparecer los casos de la cuenca mediterránea y desplazarse de manera endémica más al norte de Europa(217)(218).

Los cambios ligados a la migración de personas, deforestación y generación de grandes núcleos de población cerca de zonas con alta cantidad de flebotomos ha sido estudiada mucho en otros países(219)(110). En nuestro caso, estaría más ligado a los nuevos modelos de desarrollo urbanístico con viviendas unifamiliares con jardín, y un aumento de la tenencia de perros en estas zonas, permitiendo que en los jardines (zonas idóneas para el desarrollo de flebotomos) estos se desarrollen estando además en contacto con los reservorios.

En nuestro caso, dadas las características de nuestro estudio, la única variable ligada a una mayor exposición que hemos podido medir, fue la distancia de los domicilios a la zona

del parque. La distancia al parque salió estadísticamente significativa (p=0.017). Los pacientes expuestos viven una media de 650 metros más cerca del parque que aquellos no expuestos. Esto supone que en las viviendas más cercanas al parque, los domicilios pueden presentar una alta densidad de flebotomos en comparación con las viviendas más lejanas. Los flebotomos, anidan en zonas húmedas, y muy cerca de madrigueras y zonas donde habitan roedores, pudiendo también ser encontradas en las habitaciones de las casas (220) y característicamente los adultos vuelan distancias muy pequeñas, de unos 300 m (221), aunque se ha llegado a comprobar que pueden realizar distancias de unos 2000 m en situaciones extremas.

Por lo tanto, no es de extrañar que las personas que viven a unos 600-900 m del parque hayan estado más expuestas. Al vivir más cerca, no hace falta que el paciente presente un hábito de ir a pasear al parque, basta con vivir lo suficientemente cerca para que los flebotomos lleguen a las casas. Durante los estudios epidemiológicos que se han realizado estos años durante el brote, se han colocado trampas en los domicilios cercanos al parque, y durante la noche se han recolectado flebotomos en varias casas, lo que confirma esta cercanía.

Una diferencia llamativa que hemos descubierto durante nuestro estudio, es que los pacientes de etnia negra (de origen africano) viven más cerca que el resto de pacientes. Viven a una media de 653 metros del parque, frente a una media de 1671 metros del resto de pacientes expuestos. Este hecho podría explicar por qué existe una sobrerrepresentación de estos pacientes entre los enfermos, pero no el hecho de que no presenten leishmaniasis cutánea ni ganglionar.

8. Factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad durante el brote

En el estudio de los factores de riesgo para desarrollar la enfermedad, no interesaba comparar qué factores hacían que pacientes expuestos no desarrollaran la enfermedad, y otros sí. No se encontraron diferencias en cuanto a la edad o el sexo.

En la hipótesis inicial, interesaba estudiar, sobre todo, aquellas patologías concomitantes que pudieran suponer una inmunosupresión añadida al VIH, como por ejemplo las coinfecciones con hepatitis B y C, la presencia de diabetes, la existencia de un proceso oncológico de base, la presencia de una insuficiencia renal crónica, etc.

En el análisis realizado, no se encontró que estas condiciones tuvieran una influencia a la hora de desarrollar la enfermedad, pero al realizar el análisis multivariante, encontramos que existía un cierto peso de padecer cirrosis con OR calculado de 8.34 (IC 95% 0,87-81,19) P=0,066. Si bien no alcanza la significación estadística, si evidencia cierta tendencia, y concuerda con la impresión de nuestra experiencia clínica, donde un número importante de nuestros pacientes, sobre todo entre los que han fallecido al inicio del brote, presentaban cirrosis.

Evidentemente el hecho de presentar una leishmaniasis visceral padeciendo de base una cirrosis, causa en un alto número de casos una descompensación de esta patología con la morbimortalidad que esto conlleva (222). No existen muchos estudios que hayan indagado en si la cirrosis es un factor de riesgo para la adquisición de leishmaniasis visceral, pero se puede lanzar la hipótesis de que la esplenomegalia típica de la hipertensión portal podría hacer más fácil la supervivencia de Leishmania en este grupo de pacientes, ya que es el bazo el órgano donde L. infantum resulta más difícil de erradicar, y especialmente en bazos de

gran tamaño la carga parasitaria sería mayor. En un artículo de Pagliano et al. (222) se estudia la leishmaniasis visceral como causa de descompensación en pacientes cirróticos, y aunque el estudio no presentaba un diseño inicial para comprobar si la cirrosis es un factor de riesgo para desarrollar leishmaniasis visceral, realizan una extrapolación según la población anual de cirrosis en su área, estimando una incidencia de leishmaniasis visceral en pacientes cirróticos de entre 0.5-1/ 10,000 hab. lo que equivaldría a una incidencia unas 8-17 veces más alta que la de la población adulta del área (0.06/10,000 hab.) con una P<0.001(222). Evidentemente hay que interpretar estos resultados en el contexto de las limitaciones del diseño del estudio y ser prudentes, pero parecería interesante que esto se investigara en futuros estudios.

En cuanto a la situación del propio VIH, nos sorprendió que no parece influir la adherencia al TARGA, la línea del tratamiento ni que exista historia de resistencias. Estos datos contrastan con algunos resultados de la literatura, si bien, se trata de artículos de hace 10-15 años, donde la población era muy diferente, con un mayor porcentaje de personas ADVP, con población exclusivamente blanca y con una menor tasa de pacientes en tratamiento con TARGA (223)(224).

No se encontraron diferencias entre los niveles de $CD4^+$ actuales entre los dos grupos, pero sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P= 0.015) , encontrando que los pacientes que habían presentado niveles < 100 $CD4^+$ durante el brote, presentaban un riesgo 8 veces mayor de desarrollar leishmaniasis visceral, es decir, de enfermar, que aquellos que no presentaron niveles tan bajos. Se confirma este dato, comprobando que la media del nadir de $CD4^+$ durante el brote que presentaron los pacientes que no desarrollaron enfermedad fue de 224 cells/µl frente a un nadir medio de 110,9 en los pacientes que sí desarrollaron enfermedad (ANOVA P= 0.043).

Este hallazgo concuerda con la literatura comentada ampliamente durante el resto de la tesis, quizás sea interesante matizar que los niveles que nosotros hemos encontrado, son más bajos que aquellos que normalmente se manejan en otros estudios, encontrando que niveles de entre 200-250 cells/ μl parecen suficientes para disminuir el riesgo de desarrollar enfermedad.

El otro parámetro que mostró influencia a la hora de aumentar el riesgo de presentar enfermedad fue presentar una respuesta linfoproliferativa negativa con un índice de estimulación (SI) frente a SLA menor de 1.88. La media del SI en pacientes que no han desarrollado enfermedad (incluyendo aquí las muestras extraídas a pacientes curados) es de 5.6, frente a una media de 0.93 en aquellos pacientes que han enfermado o siguen en profilaxis.

En este punto hay que aclarar, que el principal problema que tenemos a la hora de medir y analizar la respuesta celular, es que los parámetros de linfoproliferación varían a lo largo del tiempo. Como ya hemos comentado previamente, un paciente presenta un episodio de leishmaniasis visceral (según nuestra hipótesis porque no presenta una respuesta celular positiva que le permita desarrollar una buena respuesta inmunológica) , presentando antes del tratamiento, en ese momento, una mala respuesta linfoproliferativa, siendo incapaz de estimular a sus linfocitos T $CD4^+$ y desarrollar una respuesta Th1 adecuada. Tras el tratamiento, el paciente mejora su situación inmunológica, desarrollando una respuesta celular linfoproliferativa adecuada pudiendo desarrollar (a pesar de un número bajo de $CD4^+$) una buena respuesta Th1 que sea protectora. El problema al que nos enfrentamos en este estudio fue que hubo algunos pacientes a los que cuando se les realizaron los análisis, ya estaban curados y con buena respuesta celular, y por lo tanto tenemos menos muestras del

momento de enfermedad, lo que limita el poder estadístico de nuestras conclusiones, sobre todo en el análisis multivariante.

No obstante, la diferencia es estadísticamente significativa ($p<0.001$) y supone un riesgo casi cuatro veces mayor de desarrollar la enfermedad si tenemos una respuesta celular linfoproliferativa, medida mediante índice de estimulación frente a SLA negativa (menor de 1.88).

Se ha realizado un estudio similar en pacientes trasplantados (órgano sólido) que han desarrollado leishmaniasis visceral, del área de Fuenlabrada y en seguimiento en el Hospital 12 de Octubre, realizando estas mismas pruebas inmunológicas, y con resultados que refuerzan nuestra hipótesis (167). Evidentemente, existen diferencias, ya que los pacientes bajo tratamiento inmunosupresor para trasplantes presentan un tipo de inmunosupresión diferente. Aun así, sus resultados confirman una proporción parecida de pacientes expuestos que no han desarrollado la enfermedad (21,05%) y de todos los pacientes que estudiaron, dos de ellos no consiguieron desarrollar una respuesta linfoproliferativa positiva, y los dos presentaron recaídas tempranas (unos días después y 4 meses después de los análisis), lo que refuerza de manera importante nuestra hipótesis.

En el análisis multivariado, se encontró que las variables relacionadas con el hecho de desarrollar enfermedad fueron el presentar menos de 100 $CD4^+$ durante el brote y presentar respuesta celular linfoproliferativa frente a SLA negativa (P=0,001).

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En la actualidad está teniendo lugar un brote en los municipios del suroeste de la Comunidad de Madrid que llama la atención por haberse descubierto un nuevo reservorio; la liebre, y por tratarse de una cepa que parece más virulenta de lo habitual (L. infantum ITS Lombardi).

2. El brote presenta grandes dimensiones y supone un gran riesgo para poblaciones susceptibles (pacientes VIH, pacientes en tratamiento inmunosupresor, trasplantados, etc). En nuestro estudio la prevalencia de exposición entre los pacientes asintomáticos de nuestra cohorte VIH ha sido del 15.4%, y la prevalencia estimada de exposición de la población VIH estaría entre 17-17.5%.

3. La tasa de incidencia (TI) estimada de leishmaniasis visceral en nuestra cohorte VIH de Fuenlabrada ha sido de 305.0 por 100000 pacientes-año desde el 1 de Enero de 2005 a 31 de mayo de 2009, fecha de inicio del brote, y de 413.4 casos por 100000 pacientes-año desde el 1 de Junio de 2009 hasta el fin del estudio el 31 de diciembre de 2015.

4. La leishmaniasis cutánea en los pacientes coinfectados de nuestra cohorte, no difiere de la presentada en la población Inmunocompetente; presentando clínica localizada, muy buena evolución clínica y ninguna recaída tras tratamiento.

5. El cuadro de leishmaniasis visceral en nuestra cohorte, se produce en un escenario diferente, con una población con menos cantidad de transmisión por vía parenteral y en una población con alto porcentaje de población inmigrante. Los pacientes presentan de manera

general una buena adherencia al TARGA, y una situación de aceptable control del VIH. La leishmaniasis visceral en estos pacientes se ha presentado con menos fiebre, menos esplenomegalia y menor elevación de reactantes de fase aguda (PCR, ferritina y velocidad de sedimentación).

6. A nivel del diagnóstico, las técnicas parasitológicas siguen siendo el Gold standard, pero el dipstick rK39 presenta un valor predictivo positivo que en nuestra serie fue del 100%, lo que en caso necesario permitiría acortar el tiempo hasta el comienzo del tratamiento y evitar, en lugares de alta endemicidad, la realización de técnicas invasivas y dolorosas. Por otro lado, IFAT o ELISA negativos virtualmente descartan leishmaniasis visceral en pacientes VIH. Estos resultados no difieren de los pacientes inmunocompetentes a diferencia de los descrito hasta ahora en la literatura.

7. Nuestra propuesta de estrategia diagnóstica para la leishmaniasis visceral de los pacientes VIH, ante la presencia de un cuadro clínico compatible, se basaría inicialmente en un test rápido rK39. Si es positivo, podríamos comenzar tratamiento si el paciente está inestable. Si el test rK39 es negativo, y el ELISA o el IFAT son negativos, virtualmente se descarta leishmaniasis visceral. Si la serología convencional (ELISA/IFAT) es positiva, y dado que el ELISA puede dar falsos positivos en nuestra experiencia, se debería solicitar PCR en sangre y/o aspirado de médula ósea para visualización y PCR para confirmar el diagnóstico, en función de disponibilidad. También y dado que es una técnica más invasiva, se puede reservar el aspirado de médula para aquellos pacientes con alta sospecha clínica, ELISA positivo y PCR en sangre negativa.

8. El tratamiento para la coinfección Leishmania/ VIH ha de realizarse como primera opción

con anfotericina B liposomal a dosis de 30-40mg/Kg. El no completar el tratamiento, favorece la no curación y la aparición de recaídas.

9. El presentar una respuesta linfoproliferativa POSITIVA frente a antígeno soluble de leishmania (SLA), presupondría el desarrollo de una respuesta inmune eficaz frente a L.infantum, y podría conllevar la retirada de la profilaxis secundaria, incluso en pacientes con menos de 200 $CD4^+$, de manera segura.

10. En los pacientes que presenten un respuesta linfoproliferativa NEGATIVA frente a antígeno soluble de leishmania (SLA), ha de mantenerse profilaxis mensual, y realizarse seguimiento estrecho a nivel clínico, ya que presentan alto riesgo de recidiva.

11. A la luz de nuestros resultados, la propuesta de manejo de los pacientes VIH que enferman de leishmaniasis visceral sería realizar el tratamiento propuesto en el punto 8.
Una vez finalizado el tratamiento, realizar en sangre una determinación de PCR para *Leishmania* y un test de linfoproliferación a SLA.

- Si la PCR es negativa y el SLA es positivo, el paciente se considera en bajo riesgo de recaída y NO SERIA PRECISO realizar profilaxis mensual, siempre que el paciente realice un TARGA adecuado y que consiga un buen control virológico.
    - Estos test serían repetidos cada 3 meses durante al menos un año, que es el período de mayor riesgo de recaída. Si en los sucesivos test el SLA se mantiene positivo y la PCR negativa, el paciente podemos considerarlo curado al año de seguimiento. Si en algún momento el SLA se negativiza, el riesgo de recaída es alto y habría que valorar retratamiento en función de síntomas clínicos.

- Si tras el tratamiento, el test SLA es negativo, la recomendación sería iniciar profilaxis mensual y mantenerla hasta que este test se positivizara, realizando el test cada 3 meses de forma indefinida.

12. La proximidad de la vivienda a la zona donde habitan los vectores y los reservorios, en este caso el parque de Bosquesur, supone un mayor riesgo de exposición a leishmania. Cuanto más cerca se habita, mayor es el riesgo de exposición.

13. El hecho de presentar menos de 100 $CD4^{+}$ o respuesta linfoproliferativa negativa frente a SLA, en una zona de alta endemia o de brote como es el caso de Fuenlabrada, supone un alto riesgo de desarrollar leishmaniasis visceral.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

1.Leishman|The BMJ [Internet]. [cited 2015 Dec 15].
Available from: http://www.bmj.com/content/1/5484/371

2.Leishmaniasis History [Internet]. [cited 2015 Dec 15].
Available from: http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Leishmaniasis/history.html

3.History of the discovery of the malaria parasites and their vectors [Internet]. [cited 2015 Dec 15].
Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825508/

4.WHO|WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases - Leishmaniasis [Internet].WHO.[cited 2015 Oct 19].Available from:
http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index2.html

5.WHO|Leishmaniasis [Internet].WHO.[cited 2015 Dec 15].
Available from: http://www.who.int/leishmaniasis/en/

6. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010 - Buscar con Google [Internet]. [cited 2015 Dec 15]. Available from: https://www.google.fr/search?q=Report+of+a+meeting+of+the+WHO+Expert+Committee+on+the+Control+of+Leishmaniases,+Geneva,+22%E2%80%9326+March+2010&ie=utf-8&oe=utf-8&gws_rd=cr&ei=REJwVqOSIInwasO7vNgO

7.Jorge Alvar. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.

8.Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet J-P, Soteriadou K. Leishmania donovani leishmaniasis in Cyprus. Lancet Infect Dis. 2008 Jan;8(1):6–7.

9.Velo E, Bino S, Kuli-Lito G, Pano K, Gradoni L, Maroli M. Recrudescence of visceral leishmaniasis in Albania: retrospective analysis of cases during 1997 to 2001 and results of an entomological survey carried out during 2001 in some districts. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003 May;97(3):288–90.

10.Harms G, Schönian G, Feldmeier H. Leishmaniasis in Germany. Emerg Infect Dis. 2003 Jul;9(7):872–5.

11.Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, et al. The hare (Lepus granatensis) as potential sylvatic reservoir of Leishmania infantum in Spain. Vet Parasitol. 2012 Nov;190(1-2):268–71.

12.A G, Lf S, Jd S, M H, M S, N S, et al. Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. Ann Trop Med Parasitol. 1984 Aug;78(4):369–75.

13.Diza E, Kansouzidou A, Gerou S, Vezyri E, Metallidis S, Antoniadis A. Leishmaniases in Northern Greece: seroprevalence of the infection and incidence of the disease during the period 2001–2006. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Oct;27(10):997–1003.

14.Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Eurosurveillance. 2013 Jul 25;18(30):20546.

15.Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of Leishmania infantum isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2013;18(30):20545.

16.Domínguez-Bernal G, Jiménez M, Molina R, Ordóñez-Gutiérrez L, Martínez-Rodrigo A, Mas A, et al. Characterisation of the ex vivo virulence of Leishmania infantum isolates from Phlebotomus perniciosus from an outbreak of human leishmaniosis in Madrid, Spain. Parasit Vectors. 2014;7:499.

17.Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. Cell Mol Life Sci CMLS. 2014 Apr;71(7):1245–63.

18.Cohnstaedt LW, Beati L, Caceres AG, Ferro C, Munstermann LE. Phylogenetics of the Phlebotomine Sand Fly Group Verrucarum (Diptera: Psychodidae: Lutzomyia). Am J Trop Med Hyg. 2011 Jun 1;84(6):913–22.

19.Schlein Y. Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. Parasitol Today. 1993 Jul 1;9(7):255–8.

20.Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol. 2003 Mar 1;17(1):1–18.

21.Figueiro Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, cia, Quintana SM, et al. Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar) and Pregnancy. Infect Dis Obstet Gynecol. 2004;12(1):31–40.

22.Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, et al. Transplacental Transmission of Leishmania infantum as a Means for Continued Disease Incidence in North America. PLOS Negl Trop Dis. 2011 abr;5(4):e1019.

23.Da Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MSM. First report of vertical transmission of Leishmania (Leishmania) infantum in a naturally infected bitch from Brazil. Vet Parasitol. 2009 Diciembre;166(1–2):159–62.

24.Cruz I, Morales M, Noguer I, Rodriguez A, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. The Lancet. 2002 Mar;359(9312):1124–5.

25.Suárez Rodríguez B, Isidoro Fernández B, Santos Sanz S, Moros S, José M, Molina Moreno R, et al. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de Leishmania infantum en España. Rev Esp Salud Pública. 2012 Dec;86(6):555–64.

26.Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 2009 Diciembre;136(Special Issue 14):1915–34.

27.Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. In: Parasitology B-A in, editor. Academic Press; 2004 [cited 2016 Jun 17]. p. 1–88.
Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X0457001X

28.Corrales GM. Leishmaniosis canina: situación actual en Europa, diagnóstico y control Canine leishmaniosis: current status in Europe, diagnosis and control. ResearchGate [Internet]. [cited 2016 Jun 17]; Available from:
https://www.researchgate.net/publication/242306187_Leishmaniosis_canina_situacion_actual_en_Europa_diagnostico_y_control_Canine_leishmaniosis_current_status_in_Europe_diagnosis_and_control

29.Eurosurveillance - Leishmania infantum in free-ranging hares, Spain, 2004-2010 [Internet]. [cited 2016 Jun 17]. Available from: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20541

30.Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R. Could wild rabbits (Oryctolagus cuniculus) be reservoirs for Leishmania infantum in the focus of Madrid, Spain? Vet Parasitol. 2014 May 28;202(3-4):296–300.

31.Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. Trends Immunol. 2007 Sep;28(9):378–84.

32.Anstead GM, Chandrasekar B, Zhao W, Yang J, Perez LE, Melby PC. Malnutrition Alters the Innate Immune Response and Increases Early Visceralization following Leishmania donovani Infection. Infect Immun. 2001 Aug;69(8):4709–18.

33.Oghumu SO, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of Chemokines in Regulation of Immunity against Leishmaniasis. Exp Parasitol. 2010 Nov;126(3):389–96.

34.Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against Leishmania parasites. Immunobiology. 2008;213(3-4):377–87.

35.Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. Adv Appl Microbiol. 2013;82:155–84.

36.Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced Replication of Leishmania amazonensis Amastigotes in Gamma Interferon-Stimulated Murine Macrophages: Implications for the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. Infect Immun. 2004 Feb 1;72(2):988–95.

37.Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. Cell Microbiol. 2008 Jun;10(6):1221–34.

38.Wilson ME, Jeronimo SMB, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. Microb Pathog. 2005 Apr;38(4):147–60.

39. Horrillo L, San Martín JV, Molina L, Madroñal E, Matía B, Castro A, et al. Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Mar;21(3):269–73.

40.Visceral leishmaniasis: host–parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host - International Journal of Infectious Diseases [Internet]. [cited 2016 Jun 20]. Available from: http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(13)00035-0/fulltext

41.Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, et al. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. Microbes Infect. 2005 Oct;7(13):1370–5.

42.Hernández-Pérez J, Yebra-Bango M, Jiménez-Martínez E, Sanz-Moreno C, Cuervas-Mons V, Pulpón LA, et al. Visceral Leishmaniasis (Kala-azar) in Solid Organ Transplantation: Report of Five Cases and Review. Clin Infect Dis. 1999 Aug 15;29(4):918–21.

43.Pearson RD, Sousa A de Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Dis. 1996;22(1):1–11.

44.Ahasan HA, Chowdhury MA, Azhar MA, Rafiqueuddin AK, Azad KA. Deaths in visceral

leishmaniasis (Kala-azar) during treatment. Med J Malaysia. 1996 Mar;51(1):29–32.

45.Cenderello G, Pasa A, Dusi A, Dentone C, Toscanini F, Bobbio N, et al. Varied spectrum of clinical presentation and mortality in a prospective registry of visceral leishmaniasis in a low endemicity area of Northern Italy. BMC Infect Dis. 2013 May 30;13(1):248.

46.Ortiz M, Mon C, Herrero JC, Oliet A, Rodríguez I, Ortega O, et al. Glomerulonephritis and cryoglobulinemia: first manifestation of visceral leishmaniasis. Clin Nephrol. 2015 Jun;83(6):370–7.

47. Freites-Martinez A, Córdoba S, Bermejo A, Borbujo J. Mucocutaneous leishmaniasis caused by Leishmania infantum var Lombardi in an immunocompetent patient, Spain. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2015 Sep;33(7):499–500.

48.Zijlstra EE, Ali MS, El-Hassan AM, El-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992 Sep 1;86(5):505–7.

49.Sundar S, Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002 Sep 1;9(5):951–8.

50.Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988 Jan 1;82(1):66–8.

51.Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals : AIDS [Internet]. LWW. [cited 2016 Jun 22]. Available from:
http://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/1993/02000/Diagnosis_of_visceral_leishmaniasis_in.11.aspx

52.Silva MRBD, Stewart JM, Costa CHN. Sensitivity of Bone Marrow Aspirates in the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2005 Jun 1;72(6):811–4.

53.Reithinger R, Dujardin J-C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. J Clin Microbiol. 2007 Jan 1;45(1):21–5.

54.Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin J-M, Oziol E, et al. Optimized PCR Using Patient Blood Samples For Diagnosis and Follow-Up of Visceral Leishmaniasis, with Special Reference to AIDS Patients. J Clin Microbiol. 2000 Jan 1;38(1):236–40.

55.Mary C, Faraut F, Drogoul M-P, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, et al. Reference Values for Leishmania Infantum Parasitemia in Different Clinical Presentations: Quantitative Polymerase Chain Reaction for Therapeutic Monitoring and Patient Follow-Up. Am J Trop Med Hyg. 2006 Nov 1;75(5):858–63.

56.Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. Lancet Infect Dis. 2008 Mar;8(3):191–9.

57.Okwor I, Uzonna JE. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. Immunol Res. 2013 Mar 16;56(1):163–71.

58.Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. Acta Trop. 2001 Enero;78(1):11–6.

59.Ghatei MA, Hatam GR, Hossini MH, Sarkari B. Performance of latex agglutination test (KAtex) in diagnosis of visceral leishmaniasis in Iran. Iran J Immunol IJI. 2009 Dec;6(4):202–7.

60. Riera C, Fisa R, Lopez P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, et al. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of Leishmania antigen in urine of patients with HIV-Leishmania coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2004 Dec;23(12):899–904.

61. Boelaert M, Verdonck K, Menten J, Sunyoto T, van Griensven J, Chappuis F, et al. Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. In: Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2014 [cited 2015 Nov 16]. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD009135.pub2/abstract

62.Silva ES, Schoone GJ, Gontijo CM, Brazil RP, Pacheco RS, Schallig HD. Application of Direct Agglutination Test (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. Kinetoplastid Biol Dis. 2005;4:4.

63.Adams ER, Jacquet D, Schoone G, Gidwani K, Boelaert M, Cunningham J. Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2012 Dec 13 [cited 2016 Jun 22];6(12). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3521667/

64.Gorski S, Collin SM, Ritmeijer K, Keus K, Gatluak F, Mueller M, et al. Visceral Leishmaniasis Relapse in Southern Sudan (1999–2007): A Retrospective Study of Risk Factors and Trends. PLOS Negl Trop Dis. 2010 Jun 8;4(6):e705.

65.Boelaert M, Lynen L, Desjeux P, Van der Stuyft P. Cost-effectiveness of competing diagnostic-therapeutic strategies for visceral leishmaniasis. Bull World Health Organ. 1999;77(8):667–74.

66.Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R. Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2012 Jan 31 [cited 2016 Jun 22];6(1). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3269412/

67.Comparative evaluation of DAT, IFAT and micro-ELISA in the serodiagnosis of Indian kala-azar [Internet]. [cited 2016 Sep 23]. Available from: http://medind.nic.in/imvw/imvw13195.html

68.Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan;19(1):111–26.

69.Fong D, Chan MM, Rodriguez R, Gately LJ, Berman JD, Grogl M. Paromomycin resistance in Leishmania tropica: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene. Am J Trop Med Hyg. 1994 Dec;51(6):758–66.

70.Hepburn NC, Siddique I, Howie AF, Beckett GJ, Hayes PC. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. The Lancet. 1993 Jul;342(8865):238–9.

71.Murray HW. Leishmaniasis in the United States: Treatment in 2012. Am J Trop Med Hyg. 2012 Mar 1;86(3):434–40.

72.Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop Med Int Health. 2001 Nov 1;6(11):849–54.

73. Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of Leishmania donovani. Indian J Med

Res. 2006 Mar;123(3):411–22.

74.Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am J Trop Med Hyg. 1992 Mar;46(3):296–306.

75.Prata A. TREATMENT OF KALA-AZAR WITH AMPHOTERICIN B. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1963 Jul;57:266–8.

76.Mishra M, Biswas U., Jha A., Khan A. Amphotericin versus sodium stibogluconate in first-line treatment of Indian kala-azar. The Lancet. 1994 Dec;344(8937):1599–600.

77.Seaman J, Boer C, Wilkinson R, Jong J de, Wilde E de, Sondorp E, et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome) in the Treatment of Complicated Kala-Azar Under Field Conditions. Clin Infect Dis. 1995 Jul 1;21(1):188–93.

78.Mueller M, Ritmeijer K, Balasegaram M, Koummuki Y, Santana MR, Davidson R. Unresponsiveness to AmBisome in some Sudanese patients with kala-azar. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007 Jan;101(1):19–24.

79.Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, et al. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B (AmBisome) for Visceral Leishmaniasis in Endemic Developing Countries(*). Bull World Health Organ. 1998 Jan 1;76(1):25.

80.Two Doses of a Lipid Formulation of Amphotericin B for the Treatment of Mediterranean Visceral Leishmaniasis [Internet]. [cited 2016 Jun 28].
Available from: http://cid.oxfordjournals.org/content/36/5/560.long

81.Davidson RN, di Martino L, Gradoni L, Giacchino R, Gaeta GB, Pempinello R, et al. Short-course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (AmBisome). Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1996 Jun;22(6):938–43.

82. Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India — NEJM [Internet]. [cited 2016 Jun 28]. Available from: http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa066536

83.Sinha PK, Jha TK, Thakur CP, Nath D, Mukherjee S, Aditya AK, et al. Phase 4 Pharmacovigilance Trial of Paromomycin Injection for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India, Phase 4 Pharmacovigilance Trial of Paromomycin Injection for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India. J Trop Med J Trop Med. 2011 Nov 17;2011, 2011:e645203.

84.Hailu A, Musa A, Wasunna M, Balasegaram M, Yifru S, Mengistu G, et al. Geographical Variation in the Response of Visceral Leishmaniasis to Paromomycin in East Africa: A Multicentre, Open-Label, Randomized Trial. PLOS Negl Trop Dis. 2010 Oct 26;4(10):e709.

85.Melaku Y, Collin SM, Keus K, Gatluak F, Ritmeijer K, Davidson RN. Treatment of Kala-Azar in Southern Sudan using a 17-Day Regimen of Sodium Stibogluconate Combined with Paromomycin: A Retrospective Comparison with 30-Day Sodium Stibogluconate Monotherapy. Am J Trop Med Hyg. 2007 Jul 1;77(1):89–94.

86.Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990 Apr;84(2):221–5.

87.Omollo R, Alexander N, Edwards T, Khalil EA, Younis BM, Abuzaid AA, et al. Safety and

Efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. Trials. 2011 Jun 30;12:166.

88.Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006 Dec 1;100(Supplement 1):S26–33.

89.Sundar S, Makharia A, More DK, Agrawal G, Voss A, Fischer C, et al. Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2000 Oct;31(4):1110–3.

90.Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India After a Decade of Use. Clin Infect Dis. 2012 Aug 15;55(4):543–50.

91.Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, Boots G, et al. A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2006 Aug 1;43(3):357–64.

92.Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, Singh MK, Voss A, Rosenkaimer F, et al. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. Ann Trop Med Parasitol. 1999 Sep;93(6):589–97.

93.Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. Ther Clin Risk Manag. 2007 Oct;3(5):733–40.

94.Mishra M, Biswas UK, Jha DN, Khan AB. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive kala-azar. The Lancet. 1992 Nov;340(8830):1256–7.

95.Das VNR, Siddiqui NA, Pandey K, Singh VP, Topno RK, Singh D, et al. A controlled, randomized nonblinded clinical trial to assess the efficacy of amphotericin B deoxycholate as compared to pentamidine for the treatment of antimony unresponsive visceral leishmaniasis cases in Bihar, India. Ther Clin Risk Manag. 2009;5:117–24.

96.Vn D, A R, An S, N V, Cs L, Ak G, et al. A randomized clinical trial of low dosage combination of pentamidine and allopurinol in the treatment of antimony unresponsive cases of visceral leishmaniasis. J Assoc Physicians India. 2001 Jun;49:609–13.

97.Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. Drugs. 2013;73(17):1863–88.

98.Thakur CP, Olliaro P, Gothoskar S, Bhowmick S, Choudhury BK, Prasad S, et al. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) with aminosidine (= paromomycin)-antimonial combinations, a pilot study in Bihar, India. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992 Dec;86(6):615–6.

99.Sundar S, Rai M, Chakravarty J, Agarwal D, Agrawal N, Vaillant M, et al. New Treatment Approach in Indian Visceral Leishmaniasis: Single-Dose Liposomal Amphotericin B Followed by Short-Course Oral Miltefosine. Clin Infect Dis. 2008 Oct 15;47(8):1000–6.

100.Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. The Lancet. 2011 Feb;377(9764):477–86.

101.WHO | Leishmaniasis and HIV coinfection [Internet]. WHO. [cited 2014 Sep 2]. Available

from: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/

102.Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev. 1997 Apr 1;10(2):298–319.

103.Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet J-P, et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. Clin Microbiol Rev. 2008 Apr;21(2):334–59.

104.Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct 2;97(sup1):3–15.

105.Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. Indian J Med Res. 2006 Mar;123(3):357–88.

106.Bhunia GS, Kesari S, Chatterjee N, Kumar V, Das P, Bhunia GS, et al. The Burden of Visceral Leishmaniasis in India: Challenges in Using Remote Sensing and GIS to Understand and Control, The Burden of Visceral Leishmaniasis in India: Challenges in Using Remote Sensing and GIS to Understand and Control. Int Sch Res Not Int Sch Res Not. 2012 Nov 4;2013, 2013:e675846.

107.Mestre GL da C, Fontes CJF. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso, 1998-2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2007 Feb;40(1):42–8.

108.Rabello A, Orsini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct 2;97(sup1):17–28.

109.Wolday D, Berhe N, Akuffo H, Desjeux P, Britton S. Emerging Leishmania/HIV co-infection in Africa. Med Microbiol Immunol (Berl). 2001 Aug 10;190(1-2):65–7.

110.Argaw D, Mulugeta A, Herrero M, Nombela N, Teklu T, Tefera T, et al. Risk Factors for Visceral Leishmaniasis among Residents and Migrants in Kafta-Humera, Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2013 Nov.

111.Stark D, Van Hal S, Lee R, Marriott D, Harkness J. Leishmaniasis, an Emerging Imported Infection: Report of 20 Cases From Australia. J Travel Med. 2008 Sep 1;15(5):351–4.

112.Malik AN, John L, Bryceson AD, Lockwood DN. Changing pattern of visceral leishmaniasis, United Kingdom, 1985-2004. Emerg Infect Dis. 2006;12(8):1257–9.

113.Weitzel T, Mühlberger N, Jelinek T, Schunk M, Ehrhardt S, Bogdan C, et al. Imported leishmaniasis in Germany 2001–2004: data of the SIMPID surveillance network. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005 Jul 5;24(7):471–6.

114.Scott JAG, Davidson RN, Moody AH, Grant HR, Felmingham D, Scott GMS, et al. Aminosidine (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992 Nov 1;86(6):617–9.

115. Pavli A, Maltezou HC. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. Int J Infect Dis. 2010 Diciembre;14(12):e1032–9.

116.Pratlong F, Dereure J, Deniau M, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dedet J-P. Enzymatic polymorphism during Leishmania/HIV co-infection: a study of 381 Leishmania strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct;97 Suppl 1:47–56.

117.Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, Campino L, Haralambous C, et al. Differentiation and Gene Flow among European Populations of Leishmania infantum MON-1. PLOS Negl Trop Dis. 2008 Jul 9;2(7):e261.

118.Gramiccia M, Gradoni L, Troiani M. Heterogeneity among zymodemes of Leishmania infantum from HIV-positive patients with visceral leishmaniasis in south Italy. FEMS Microbiol Lett. 1995 Apr 15;128(1):33–8.

119.Gramiccia M. The identification and variability of the parasites causing leishmaniasis in HIV-positive patients in Italy. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct;97 Suppl 1:65–73.

120.Chicharro C, Jiménez MI, Alvar J. Iso-enzymatic variability of Leishmania infantum in Spain. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct;97 Suppl 1:57–64.

121.Olivier M, Badaró R, Medrano FJ, Moreno J. The pathogenesis of Leishmania/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct;97 Suppl 1:79–98.

122.Cota GF, Sousa MR de, Nogueira BM de F, Gomes LI, Oliveira E, Assis TSM, et al. Comparison of Parasitological, Serological, and Molecular Tests for Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients: A Cross-Sectional Delayed-Type Study. Am J Trop Med Hyg. 2013 Sep 4;89(3):570–7.

123.Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Aug 21;8(8):e3021.

124.Martin-Sanchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sanchez C, Castro-Fajardo JJ, Pineda JA, Morillas-Marquez F. Diagnosis of infections with Leishmania infantum using PCR–ELISA. Parasitology. 2001 Jun;122(06):607–15.

125.Hailu A, Berhe N. The performance of direct agglutination tests (DAT) in the diagnosis of visceral leishmaniasis among Ethiopian patients with HIV co-infection. Ann Trop Med Parasitol. 2002 Enero;96(1):25–30.

126.Horst R ter, Tefera T, Assefa G, Ebrahim AZ, Davidson RN, Ritmeijer K. Field Evaluation of rK39 Test and Direct Agglutination Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in a Population with High Prevalence of Human Immunodeficiency Virus in Ethiopia. Am J Trop Med Hyg. 2009 Jun 1;80(6):929–34.

127.TDR | Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance [Internet]. WHO. [cited 2016 Sep 27]. Available from: http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/vl-rdt-evaluation/en/

128.Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIV-Uninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review of the Literature [Internet]. [cited 2016 Feb 4]. Available from:
http://cid.oxfordjournals.org/content/44/12/1602.long

129.Cota GF, de Sousa MR, Demarqui FN, Rabello A. The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(5):e1665.

130.Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F, et al. Relapses versus Reinfections in Patients Coinfected with Leishmania infantum and Human Immunodeficiency Virus Type 1. J Infect Dis. 2002 May 15;185(10):1533–7.

131.Casado JL, Lopez-Velez R, Pintado V, Quereda C, Antela A, Moreno S. Relapsing visceral leishmaniasis in HIV-infected patients undergoing successful protease inhibitor therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2001 Mar;20(3):202–5.

132.Postigo C, Llamas R, Zarco C, Rubio R, Pulido F, Costa JR, et al. Cutaneous lesions in patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. J Infect. 1997 Nov 1;35(3):265–8.

133.R Russo FL. Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97 Suppl 1((Suppl 1)):99–105.

134.Russo R, Nigro LC, Minniti S, Montineri A, Gradoni L, Caldeira L, et al. Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: Treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). J Infect. 1996 Mar;32(2):133–7.

135.Delgado J, Macías J, Pineda JA, Corzo JE, González-Moreno MP, Rosa R de la, et al. High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. Am J Trop Med Hyg. 1999 Nov 1;61(5):766–9.

136.Amphotericin B lipid complex versus meglumine antimoniate in the treat- ment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. J. Antimicrob - Buscar con Google [Internet]. [cited 2015 Dec 16]. Available from:
https://www.google.es/?gws_rd=ssl#q=Amphotericin+B+lipid+complex+versus+meglumine+antimoniate+in+the+treat+ment+of+visceral+leishmaniasis+in+patients+infected+with+HIV:+a+randomized+pilot+study.+J.+Antimicrob

137.Troya J, Casquero A, Refoyo E, Fernández-Guerrero ML, Górgolas M. Long term failure of miltefosine in the treatment of refractory visceral leishmaniasis in AIDS patients. Scand J Infect Dis. 2008 Enero;40(1):78–80.

138.S Pandey BD, Pandey K, Kaneko O, Yanagi T, Hirayama K. Relapse of Visceral Leishmaniasis after Miltefosine Treatment in a Nepalese Patient. Am J Trop Med Hyg. 2009 Apr 1;80(4):580–2.

139.Oral Miltefosine for Leishmaniasis in Immunocompromised Patients: Compassionate Use in 39 Patients with HIV Infection. [cited 2015 Dec 15].
Available from: http://cid.oxfordjournals.org/content/39/10/1520.full.pdf+html

140.Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan;19(1):111–26.

41.Maarouf M, Adeline MT, Solignac M, Vautrin D, Robert-Gero M. Development and characterization of paromomycin-resistant Leishmania donovani promastigotes. Parasite Paris Fr. 1998 Jun;5(2):167–73.

142.Rybniker J, Goede V, Mertens J, Ortmann M, Kulas W, Kochanek M, et al. Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure — a case report and brief review of the literature. Int J Infect Dis. 2010 Jun 1;14(6):e522–5.

143.Savoia D, Allice T, Tovo P-A. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. Int J

Antimicrob Agents. 2005 Jul;26(1):92–4.

144.Johan van Griensven ED. HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-co-infected individuals. Lancet Infect Dis. Lancet Infect Dis. 2013;13(3):251–9.

145.Trudel N, Garg R, Messier N, Sundar S, Ouellette M, Tremblay MJ. Intracellular survival of Leishmania species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. J Infect Dis. 2008 Nov 1;198(9):1292–9.

146.Valdivieso E, Rangel A, Moreno J, Saugar JM, Cañavate C, Alvar J, et al. Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on Leishmania sp. Exp Parasitol. 2010 Dec;126(4):557–63.

147.Vallejo A, Abad-Fernández M, Moreno S, Moreno A, Pérez-Elías MJ, Dronda F, et al. High levels of $CD4^+$ $CTLA\text{-}4^+$ Treg cells and CCR5 density in HIV-1-infected patients with visceral leishmaniasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2015 Feb;34(2):267–75.

148.Sharma SK, Soneja M. HIV & immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). Indian J Med Res. 2011 Dec;134(6):866–77.

149.Antinori S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Acquaviva V, Foschi A, et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis as an immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with acquired immune deficiency syndrome. Br J Dermatol. 2007 Nov;157(5):1032–6.

150.Barragán P, López-Velez R, Olmo M, Podzamczer D. Visceral Leishmaniasis Treated with Antimonials/Paromomycin followed by Itraconazole/Miltefosine after Standard Therapy Failures in a Human Immunodeficiency Virus–Infected Patient. Am J Trop Med Hyg. 2010 Jul 1;83(1):10–2.

151.Soriano V, Dona C, Rodríguez-Rosado R, Barreiro P, González-Lahoz J. Discontinuation of secondary prophylaxis for opportunistic infections in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. AIDS Lond Engl. 2000 Mar 10;14(4):383–6.

152.Villanueva JL, Alarcón A, Bernabeu-Wittel M, Cordero E, Prados D, Regordán C, et al. Prospective evaluation and follow-up of European patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2000 Oct;19(10):798–801.

153.Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. Real-Time PCR Assay for Clinical Management of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Visceral Leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2003 Nov 1;41(11):5080–4.

154.Zijlstra EE, el-Hassan AM, Ismael A, Ghalib HW. Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1994 Dec;51(6):826–36.

155.Moral L, Rubio EM, Moya M. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacantí region (Spain): implications for the epidemiology of Leishmania infantum infection in southern Europe. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002 Apr;96(2):129–32.

156.Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Sánchez C, García-Martínez J, López Lacomba D, San Martin JV, et al. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where Leishmania infantum is endemic. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Jun 3;

157.Pasquau F, Ena J, Sanchez R, Cuadrado JM, Amador C, Flores J, et al., Leishmania HIV Mediterreanean Co-operative Group. Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterreanean region. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2005 Jun;24(6):411–8.

158. Bourgeois N, Lachaud L, Reynes J, Rouanet I, Mahamat A, Bastien P. Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. J Acquir Immune Defic Syndr 1999. 2008 May 1;48(1):13–9.

159.A AO, M MM, A HA, Elamin MY, Younis BM, E ME, et al. Visceral leishmaniasis-hepatitis B/C coinfections: a rising necessity to triage patients for treatment. Ann Saudi Med. 2014 Apr;34(2):143–6.

160.Singh S null, Kumar J, Singh R, Dwivedi SN. Hepatitis B and C viral infections in Indian kala-azar patients receiving injectable anti-leishmanial drugs: a community-based study. Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis. 2000;4(4):203–8.

161.Cooper CL, Badley AD, Angel JB. Characteristics of hepatitis C virus infection in HIV-infected people. Can J Infect Dis. 2001;12(3):157–63.

162.Sierra B de la C, Kourí G, Guzmán MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. Arch Virol. 2006 Nov 16;152(3):533.

163.Esper AM, Moss M, Lewis CA, Nisbet R, Mannino DM, Martin GS. The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. Crit Care Med. 2006 Oct;34(10):2576–82.

164.Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, et al. Ethnicity Greatly Influences Cytokine Gene Polymorphism Distribution. Am J Transplant. 2002 Jul 1;2(6):560–7.

165.Delgado JC, Baena A, Thim S, Goldfeld AE. Ethnic-Specific Genetic Associations with Pulmonary Tuberculosis. J Infect Dis. 2002 Nov 15;186(10):1463–8.

166.Ficha informativa 2015 [Internet]. [cited 2016 Jun 2]. Available from: http://www.unaids.org/es/resources/campaigns/HowAIDSchangedeverything/factsheet

167. Carrillo E, Carrasco-Antón N, López-Medrano F, Salto E, Fernández L, San Martín JV, et al. Cytokine Release Assays as Tests for Exposure to Leishmania, and for Confirming Cure from Leishmaniasis, in Solid Organ Transplant Recipients. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015 Oct 23 [cited 2016 Oct 4];9(10). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4619795/

168.Alvar J, Bashaye S, Argaw D, Cruz I, Aparicio P, Kassa A, et al. Kala-Azar Outbreak in Libo Kemkem, Ethiopia: Epidemiologic and Parasitologic Assessment. Am J Trop Med Hyg. 2007 Aug 1;77(2):275–82.

169.Sordo L, Gadisa E, Custodio E, Cruz I, Simón F, Abraham Z, et al. Low Prevalence of Leishmania Infection in Post-Epidemic Areas of Libo Kemkem, Ethiopia. Am J Trop Med Hyg. 2012 Jun 1;86(6):955–8.

170.Leta S, Dao THT, Mesele F, Alemayehu G. Visceral Leishmaniasis in Ethiopia: An Evolving Disease. PLOS Negl Trop Dis. 2014 Sep 4;8(9):e3131.

171.Hailu A, Gramiccia M, Kager PA. Visceral leishmaniasis in Aba-Roba, south-western Ethiopia: prevalence and incidence of active and subclinical infections. Ann Trop Med Parasitol. 2009 Dec;103(8):659–70.

172.Oliveira F, Doumbia S, Anderson JM, Faye O, Diarra SS, Traoré P, et al. Discrepant Prevalence and Incidence of Leishmania Infection between Two Neighboring Villages in Central Mali Based on Leishmanin Skin Test Surveys. PLOS Negl Trop Dis. 2009 dic;3(12):e565.

173.Evaluation of Leishmanin Skin Test in Indian Visceral Leishmaniasis [Internet]. [cited 2016 Jun 15]. Available from: http://www.ajtmh.org/content/80/4/566.long

174.Ena J, Pasquau F, López-Perezagua M del M, Martinez-Peinado C, Arjona F. Screening for subclinical Leishmania infection in HIV-infected patients living in eastern Spain. Pathog Glob Health. 2014 Diciembre;108(8):356–61. s

175.Gil-Prieto R, Walter S, Alvar J, de Miguel AG. Epidemiology of Leishmaniasis in Spain Based on Hospitalization Records (1997-2008). Am J Trop Med Hyg. 2011 Nov 1;85(5):820–5.

176.Valcárcel Y, Bastero R, Anegón M, González S, Gil Á. Epidemiología de los ingresos hospitalarios por leishmaniasis en España (1999-2003). Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2008 May;26(5):278–81.

177.Response WHOD of E and PA and. Leishmani. 2000 [cited 2016 Sep 29]; Available from: http://www.who.int/iris/handle/10665/66625

178.Rabello A, Orsini M, Disch J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct 2;97(sup1):17–28.

179.Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol. 2000 Sep 1;25(5):363–70.

180.Couppié P, Clyti E, Sobesky M, Bissuel F, Del Giudice P, Sainte-Marie D, et al. Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. Br J Dermatol. 2004 Diciembre;151(6):1165–71.

181.Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: environmental and behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. J Infect Dis. 1993 Sep;168(3):709–14.

182.Shiddo SA, Aden Mohamed A, Akuffo HO, Mohamud KA, Herzi AA, Herzi Mohamed H, et al. Visceral leishmaniasis in Somalia: prevalence of markers of infection and disease manifestations in a village in an endemic area. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995 Aug;89(4):361–5.

183.Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, del Pilar Agudelo S. [Gender and cutaneous leishmaniasis in Colombia]. Cad Saúde Pública. 2001 Feb;17(1):171–80.

184.Roberts CW, Satoskar A, Alexander J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. Parasitol Today Pers Ed. 1996 Oct;12(10):382–8.

185.Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. Clin Microbiol Rev. 2001 Jul;14(3):476–88.

186.Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR. Sex Hormones and Modulation of Immunity against Leishmaniasis. Neuroimmunomodulation. 2009 Feb 11;16(2):106–13.

187.Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender Is a Major Determinant of the Clinical Evolution and Immune Response in Hamsters Infected with Leishmania spp. Infect Immun. 2002 May;70(5):2288–96.

188.Aguado M, Espinosa P, Romero-Maté A, Tardío JC, Córdoba S, Borbujo J. Brote de leishmaniasis cutánea en el municipio de Fuenlabrada. Actas Dermo-Sifiliográficas. 2013 May;104(4):334–42.

189.Blázquez-Gamero D, Domínguez-Pinilla N, Chicharro C, Negreira S, Galán P, Pérez-Gorricho B, et al. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children with Visceral Leishmaniasis: Pediatr Infect Dis J. 2015 Jun;34(6):667–9.

190.Ibrahim ME, Lambson B, Yousif AO, Deifalla NS, Alnaiem DA, Ismail A, et al. Kala-azar in a high transmission focus: an ethnic and geographic dimension. Am J Trop Med Hyg. 1999 Dec;61(6):941–4.

191.Lyons S, Veeken H, Long J. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. Trop Med Int Health. 2003 Agosto;8(8):733–9.

192.Pintado V, Martín-Rabadán P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. Medicine (Baltimore). 2001 Jan;80(1):54–73.

193.Pintado V, López-Vélez R. HIV-associated visceral leishmaniasis. Clin Microbiol Infect. 2001 Jun;7(6):291–300.

194.Fernández-Guerrero ML, Aguado JM, Buzón L, Barros C, Montalbán C, Martín T, et al. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. Am J Med. 1987 Dec;83(6):1098–102.

195.Martinez-Subiela S, Cerón JJ, Strauss-Ayali D, Garcia-Martinez JD, Tecles F, Tvarijonaviciute A, et al. Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2014 Jan;37(1):23–9.

196.Held TK, Trautmann M, Poggensee U, Mravak S. Ferritin as the earliest prognostic marker in a case of visceral leishmaniasis. J Infect. 1991 Jul;23(1):103–4.

197.Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. in diagnostic samples from humans and dogs. J Clin Microbiol. 1995 May;33(5):1145–9.

198.Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. *Available:* *ww*w.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf

199.Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct;97 Suppl 1:115–33.

200.Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2007 Jun 15;44(12):1602–10.

201.Davidson RN, Martino LD, Gradoni L, Giacchino R, Russo R, Gaeta GB, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. QJM.

1994 Feb 1;87(2):75–81.

202.Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda – DNDi [Internet]. [cited 2016 Jun 28]. Available from: http://www.dndi.org/2002/media-centre/scientific-articles/scientific-articles-vl/visceral-leishmaniasis-current-status-of-control-diagnosis-and-treatment-and-a-proposed-research-and-development-agenda/

203.Grabmeier-Pfistershammer K, Poeppl W, Brunner PM, Rappersberger K, Rieger A. Clinical Challenges in the Management of Leishmania/HIV Coinfection in a Nonendemic Area: A Case Report. Case Rep Infect Dis [Internet]. 2012 [cited 2016 Sep 30];2012. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534205/

204.Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. Rev Iberoam Micol. 2009 Oct;26(4):223–7.

205.Maddux MS, Barriere SL. A Review of Complications of Amphotericin-B Therapy: Recommendations for Prevention and Management. Ann Pharmacother. 1980 Mar 1;14(3):177–81.

206.Pathak A, Pien FD, Carvalho L. Amphotericin B Use in a Community Hospital, with Special Emphasis on Side Effects. Clin Infect Dis. 1998 Feb 1;26(2):334–8.

207.Sindermann H, Engel KR, Fischer C, Bommer W, Program MCU. Oral Miltefosine for Leishmaniasis in Immunocompromised Patients: Compassionate Use in 39 Patients with HIV Infection. Clin Infect Dis. 2004 Nov 15;39(10):1520–3.

208.Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, Vries PJ de. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. J Antimicrob Chemother. 2012 Nov 1;67(11):2576–97.

209.López-Vélez R, Casado JL, Pintado V. Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART). Clin Microbiol Infect. 2001 Jul 1;7(7):394–5.

210.Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV-Infected Patients: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2011 Jun 7 [cited 2015 Jul 14];5(6). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110161/

211.Yeni PG, Hammer SM, Hirsch MS, et al. Treatment for adult hiv infection: 2004 recommendations of the international aids society-usa panel. JAMA. 2004 Jul 14;292(2):251–65.

212.Kubar J, Marty P, Lelièvre A, Quaranta JF, Staccini P, Caroli-Bosc C, et al. Visceral leishmaniosis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. AIDS Lond Engl. 1998 Nov 12;12(16):2147–53.

213.Horst R ter, Collin SM, Ritmeijer K, Bogale A, Davidson RN. Concordant HIV Infection and Visceral Leishmaniasis in Ethiopia: The Influence of Antiretroviral Treatment and Other Factors on Outcome. Clin Infect Dis. 2008 Jun 1;46(11):1702–9.

214.Moreno J, Cañavate C, Chamizo C, Laguna F, Alvar J. HIV--Leishmania infantum co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000 Jun;94(3):328–32.

215.Griensven J van, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in

immunosuppressed individuals. Clin Microbiol Infect. 2014 Apr 1;20(4):286–99.

216.Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Sáez V, Irigaray C, Martín-Sánchez J. Risk maps for the presence and absence of Phlebotomus perniciosus in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. Parasitology. 2011 Sep;138(10):1234–44.

217.Climate change and infectious diseases in Europe - The Lancet Infectious Diseases [Internet]. [cited 2016 Jun 29]. Available from:
http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(09)70104-5/abstract

218.Dhiman RC, Pahwa S, Dhillon GPS, Dash AP. Climate change and threat of vector-borne diseases in India: are we prepared? Parasitol Res. 2010 Mar;106(4):763–73.

219.Yared S, Deribe K, Gebreselassie A, Lemma W, Akililu E, Kirstein OD, et al. Risk factors of visceral leishmaniasis: a case control study in north-western Ethiopia. Parasit Vectors. 2014;7:470.

220.Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol. 2004 Mar;18(1):71–80.

221.Claborn DM. The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. J Glob Infect Dis. 2010;2(2):127–34.

222.Pagliano P, Carannante N, Gramiccia M, Ascione T, Stornaiuolo G, Gradoni L, et al. Visceral leishmaniasis causes fever and decompensation in patients with cirrhosis. Gut. 2007 Jun;56(6):893–4.

223.Pineda JA, Gallardo JA, Macías J, Delgado J, Regordán C, Morillas F, et al. Prevalence of and Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients in Southern Spain. J Clin Microbiol. 1998 Sep;36(9):2419–22.

224.De La Rosa R, Pineda JA, Delgado J, Macías J, Morillas F, Mira JA, et al. Incidence of and risk factors for symptomatic visceral leishmaniasis among human immunodeficiency virus type 1-infected patients from Spain in the era of highly active antiretroviral therapy. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):762–7.

225.Documento de Prevención y Tratamiento de Infecciones Oportunistas y otras Coinfecciones en pacientes con infección por VIH. Actualización Mayo 2015. Guía Clínica de GESIDA (Grupo de Estudio del SIDA-SEIMC), disponible en:
http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2015/gesida-guiasclinicas-2015-InfeccionesOportunistasyCoinfeccionesVIH.pdf. Descargado el 01-10-2016.

226.Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Available at http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf. Accessed 01-10-2016, page T-20.

VIII ANEXOS

ANEXO I: Test de homogeneidad de muestra seleccionada para estudio de test parasitológicos y de respuesta inmune

Las características clínicas y epidemiológicas de la cohorte total de pacientes VIH y de la muestra seleccionada para realización de los test se encuentran resumidas en la Tabla 1. Podemos destacar que hay predominio de varones, la edad al diagnóstico es de 32 años, y casi un 30% de pacientes de origen africano.

En la tabla siguiente se observa las comparación de las características de la muestras del estudio versus población total VIH en seguimiento en el Hospital de Fuenlabrada.

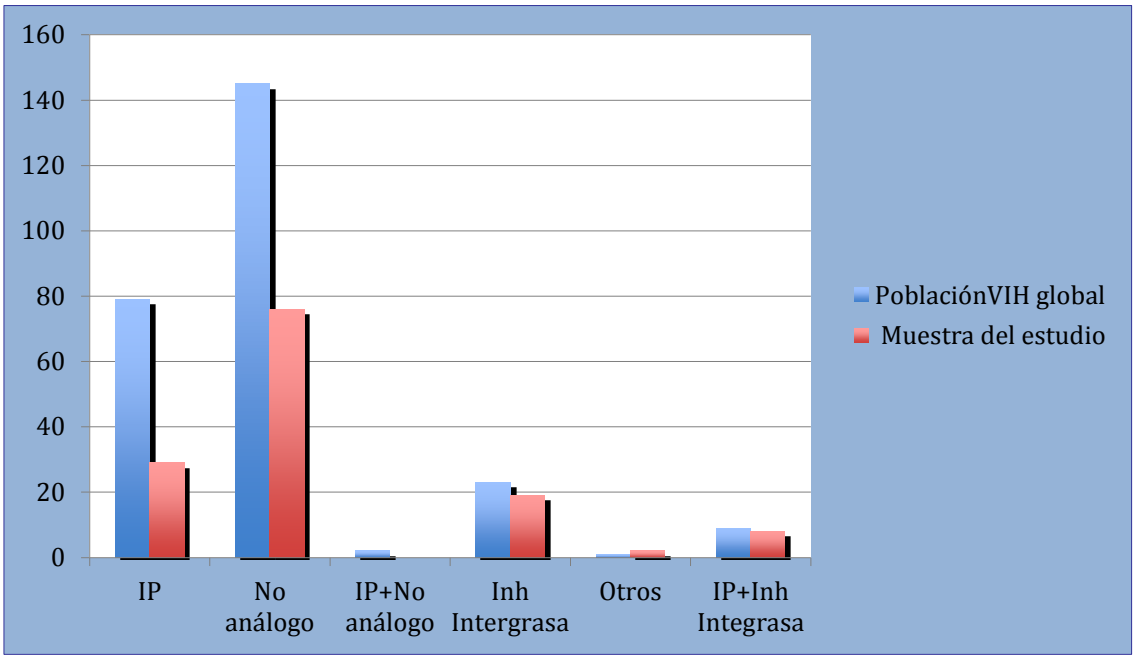
	Población general VIH (n= 295)	Nuestra muestra (n= 135)	P
Sexo	Varones 194 (65,9 %)	Varones 97 (71,9%)	0,2
Edad media al diagnóstico (media + SD)	32,7 + 10,4	33,9+ 11,5	NS
Adherencia mala al tratamiento	28,8 %	29,3 %	0,9
VHB activa	7,3 %	6,7 %	0,8
VHC	32,5 %	27,9 %	0,3
Diabetes	4,3 %	2,9 %	0.6
Origen africano	27,6 %	24,4%	0,5
Última carga viral >50 (carga viral detectable)	18,6 %	12,8 %	0,2
Nadir de CD4 menos de 100	65 (26,4%)	52 (42,6%)	0.01

No existen diferencias significativas entre los grupos por lo que podemos considerar nuestra muestra de pacientes con test realizados representativa de la cohorte global.

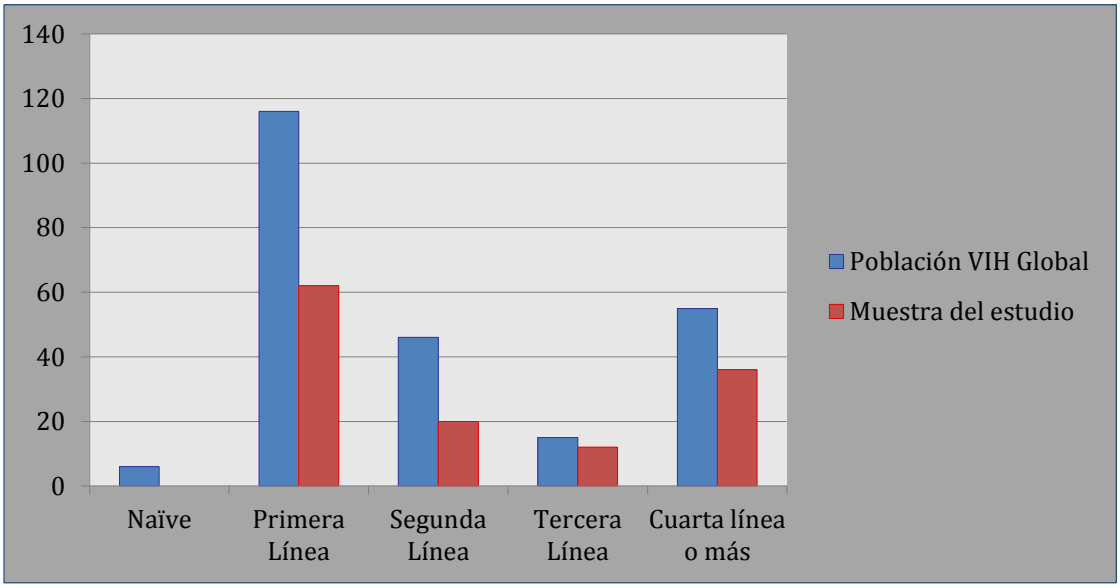
Se compararon también otras variables analizadas que no se muestran en la Tabla. El porcentaje de pacientes con resistencias a los antirretrovirales fue un 12,1 % de pacientes con resistencias primarias en la muestra global versus un 13,9% en nuestra muestra de 135 pacientes, diferencias que no fueron estadísticamente significativas (p 0,8). En la distribución por subtipos de VIH predomina el subtipo B con un 65% de los pacientes, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Este subtipo viene seguido con casos aislados, de los subtipos CRF02_AG y el subtipo A.

Con respecto al tratamiento y el número de líneas de tratamiento que el paciente ha realizado, no existen tampoco diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, y su distribución se puede observar en los siguientes dos gráficos.

Tipo de tratamiento antirretroviral en la población VIH global versus la muestra del estudio.



Línea de tratamiento en la que están los pacientes en la población VIH global versus la muestra del estudio.



Anexo II. Consentimiento informado para participar en el estudio de investigación

ESTUDIO SOBRE EL IMPACTO DEL BROTE DE LEISHMANIASIS DEL SUROESTE DE MADRID EN LA POBLACION INMUNOSUPRIMIDA
Estudio sobre población con infección crónica por VIH

Investigador Principal del Hospital de Fuenlabrada: Dr. Juan V. San Martín López.
Co-investigador(es) del Hospital de Fuenlabrada: Dra. Alicia Castro Gordon

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

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

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

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

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

¿Cuál es el propósito del estudio?

Recientemente se ha detectado un brote de una enfermedad infecciosa llamada Leishmaniasis en la ciudad de Fuenlabrada. La Leishmaniasis se adquiere por la picadura de un mosquito que inocula un parásito (la Leishmania) en la sangre del ser humano. Tiene

varias presentaciones clínicas, desde la forma cutánea hasta la visceral, que es la más grave y puede suponer una situación de riesgo vital. Se trata de una enfermedad rara sobre la que existe poca información por su poca frecuencia.

Este brote endémico es una oportunidad para un mejor estudio de esta enfermedad y valorar la necesidad de la prevención en pacientes de alto riesgo de padecer la enfermedad, como los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

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

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Vd. está invitado a participar porque su condición de paciente VIH le confiere especial susceptibilidad a poder padecer dicha enfermedad, por lo que consideramos de especial interés, caracterizar la evolución de dicha enfermedad,

¿En qué consiste mi participación?

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

¿Cuáles son los riesgos y molestias?

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

¿Obtendré algún beneficio por participar?

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

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

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

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

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

¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos?

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

Sólo el equipo investigador y las autoridades sanitarias, que tienen deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se podrá transmitir a terceros la información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa de nuestro país.

¿Qué ocurrirá con las muestras obtenidas?

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

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

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

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

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Vd. no será retribuido por participar.

Los investigadores no recibirán dinero por participar en el estudio.

¿Quién me puede dar más información?

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

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

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio de Investigación:

ESTUDIO SOBRE EL IMPACTO DEL BROTE DE LEISHMANIASIS DEL SUROESTE DE MADRID EN LA POBLACION INMUNOSUPRIMIDA
Estudio sobre población con infección crónica por VIH

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

Co-investigador(es):Dra. Castro, Dr. Horrillo, Dra. Matía Tfno. 916006186

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

Persona del centro que informa …….DNI……

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

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

Confirmo que:
1. Autorizo mi participación en el "ESTUDIO SOBRE EL IMPACTO DEL BROTE DE LEISHMANIASIS DEL SUROESTE DE MADRID EN LA POBLACION INMUNOSUPRIMIDA. Estudio sobre población con infección crónica por VIH"
o SI o NO

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

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

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

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

PARTICIPANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma	Firma

En....., a..... de……. de.....