



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

SITUACIÓN DE LA LEISHMANIOSIS EN LA COMUNIDAD DE MADRID

Autor: Ana Olmos Trigo

Tutor: María Isabel Jiménez Alonso

Convocatoria: Julio

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT

1.	INTRODUCCIÓN	4
1.1.	IMPORTANCIA DE LA LEISHMANIOSIS	4
1.2.	CICLO BIOLÓGICO Y TRANSMISIÓN	4
1.3.	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	5
2.	OBJETIVOS	6
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	6
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4.1.	SITUACIÓN DE LA LEISHMANIOSIS EN ESPAÑA	6
4.2.	SITUACIÓN DE LA LEISHMANIOSIS EN LA COMUNIDAD DE MADRID.....	7
4.3.	VIGILANCIA Y CONTROL DEL VECTOR	9
4.4.	RESERVORIO: DOMÉSTICO Y SILVESTRE	10
4.5.	GESTIÓN INICIAL DEL BROTE EPIDÉMICO DE LEISHMANIOSIS Y PLAN DE MEDIDAS DE CONTROL	11
4.6.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS	12
4.7.	EVOLUCIÓN Y ANÁLISIS ESPACIAL DE LOS CASOS DE LEISHMANIOSIS	14
5.	CONCLUSIONES.....	17
6.	BIBLIOGRAFÍA	18

RESUMEN

En España, la leishmaniosis es una zoonosis hipoendémica presente, mayoritariamente, en el litoral mediterráneo y en el centro de la Península. Las formas de presentación clínica de la enfermedad, leishmaniosis cutánea (LC) y leishmaniosis visceral (LV), son causadas por la especie *Leishmania infantum*. Los vectores responsables de la transmisión son dípteros del género *Phlebotomus* (*Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*).

A partir del año 2009, se produjo un incremento inusual del número de casos de leishmaniosis en humanos en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Se observó que las alteraciones medioambientales y los cambios en el uso del suelo producidos en los últimos años, así como la elevada densidad de población de *P. perniciosus*, justificaban el brote.

Se descubrió, además, la participación activa de dos nuevos reservorios, las liebres y los conejos, en la transmisión, lo que supuso un hallazgo novedoso, puesto que se consideraba al perro como el único reservorio de la enfermedad en nuestro país.

Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos y entomológicos en la zona afectada y otras zonas de la Comunidad de Madrid con características ambientales similares a las del brote, con el objetivo de estudiar y analizar la evolución de los casos de leishmaniosis en la Comunidad de Madrid y definir su situación actual.

ABSTRACT

The leishmaniasis is a hypoendemic zoonosis in Spain, predominantly in the Mediterranean coast and the center of the Peninsula. The clinical forms of the disease, cutaneous leishmaniasis (CL) and visceral leishmaniasis (VL), are caused by the species *Leishmania infantum*. The vectors that are responsible for the transmission are Diptera of the genus *Phlebotomus* (*P. perniciosus* and *P. ariasi*).

In 2009, there was an unusual increase in the number of leishmaniasis cases in the southwestern area of the Community of Madrid. Multiple and diverse factors such as environmental alterations, land-use changes and the high population density of *P. perniciosus* the causative vector justified the outbreak.

Furthermore, two new reservoirs of this disease, namely, hares and rabbits, were found. This striking finding was novel at that time since the dog was considered the only reservoir of the disease in our country.

Since then, numerous epidemiological and entomological studies have been carried out in the affected area and other areas of the Community of Madrid with environmental characteristics similar to those of the outbreak, with the aim of studying and analyzing the evolution of cases of leishmaniasis in the Community of Madrid and defining its current situation.

Palabras clave: leishmaniosis, Comunidad de Madrid, *Phlebotomus*, vigilancia epidemiológica, *Leishmania infantum*, PCR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DE LA LEISHMANIOSIS

La leishmaniosis es un conjunto de enfermedades causadas por protozoos pertenecientes al género *Leishmania*. Es transmitida por un hospedador invertebrado o vector biológico; concretamente por dípteros hematófagos hembras del género *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo), denominados coloquialmente como flebotomos. Es una enfermedad extendida a nivel mundial que tiene como reservorios animales domésticos, silvestres y, en ocasiones, al hombre. Se conocen unas 30 especies de *Leishmania* de las que unas 20 pueden causar la enfermedad en el hombre. Diferentes factores ligados tanto a la actividad humana, como a los cambios climáticos influyen en su distribución y hacen que se considere una enfermedad reemergente. Esta se presenta bajo diversas formas clínicas, normalmente, leishmaniosis visceral, cutánea y mucocutánea ¹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) sitúa a la leishmaniosis en el noveno lugar por importancia de las enfermedades infecciosas y en el tercer lugar de las enfermedades parasitarias que causan mayor mortalidad ².

La leishmaniosis sigue siendo una de las enfermedades más olvidadas del mundo, afectando principalmente en los países en vías de desarrollo, donde la población es más pobre. Se considera que unos 310 millones de personas viven en zonas de riesgo en áreas endémicas del parásito y que existe una incidencia de 1,2 millones de casos nuevos anualmente ³.

1.2. CICLO BIOLÓGICO Y TRANSMISIÓN

El ciclo de transmisión (Figura 1) se inicia cuando una hembra de flebotomo ingurgita sangre de un hospedador vertebrado que contiene macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania*. El ciclo continúa en el intestino medio donde tiene lugar la metaciclogénesis, en el que las formas amastigotes se multiplican y transforman en promastigotes procíclicos, que posteriormente migran hacia la válvula estomodeal en el intestino anterior y reinician su división transformándose en las formas infectivas, los promastigotes metacíclicos. Este ciclo dura de 4 a 10 días.

Cuando la hembra de flebotomo vuelve a alimentarse de la sangre de otro vertebrado, esta inocula los promastigotes metacíclicos, activando el sistema fagocítico mononuclear del hospedador. Estas formas infectivas son fagocitadas por los macrófagos del tejido conectivo y, a su vez, por los lisosomas de los mismos, lugar donde se produce la transformación a la forma amastigote. Esta conversión está mediada por varios factores, entre ellos se encuentra la temperatura (35°C) y el pH. Los amastigotes se replican en los macrófagos que los destruyen e infectan progresivamente.

La diseminación del parásito y el desarrollo de la enfermedad dependen del tipo y la eficacia de la respuesta inmunitaria del hospedador infectado. Solo las hembras de flebotomo son hematófagas, por lo que son las únicas transmisoras de la enfermedad ^{4,5}.

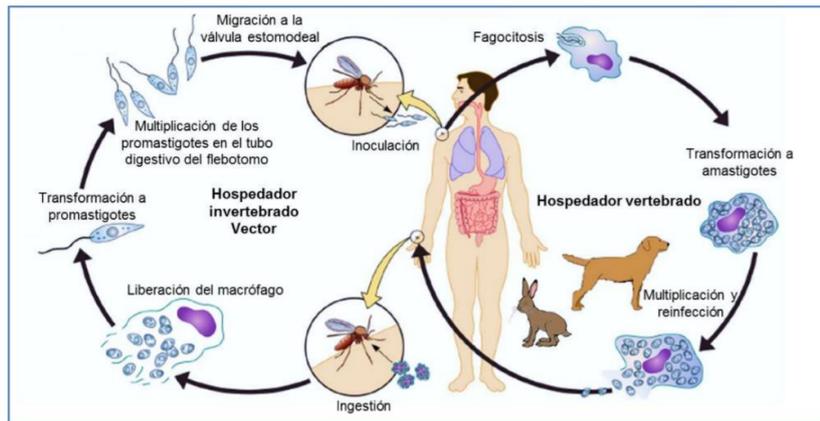


Figura 1. Ciclo de *Leishmania* en el flebotomo y en el hospedador vertebrado. Fuente. Tesis Doctoral, González E, 2019 ⁶.

En España, las especies de flebotomos responsables de la transmisión del parásito son *Phlebotomus perniciosus* y en menor grado, *Phlebotomus ariasi*. Estos dípteros ponen los huevos en lugares arenosos, oscuros, húmedos (humedad relativa superior al 90%), a temperatura constante (20-25°C) y ricos en materia orgánica (madrigueras, huecos de los árboles, leñeras, vertederos), entornos y condiciones ambientales que se pueden encontrar en zonas periurbanas en la Comunidad de Madrid. El período de actividad de la fase adulta del flebotomo está comprendida de mayo a octubre.

P. perniciosus presenta dos picos de densidad de población en los meses de julio y septiembre. Su actividad es mayor al anochecer y durante la noche siempre que existan temperaturas superiores a 16-18°C y no se den condiciones climáticas adversas como lluvia o viento. Poseen un pronunciado fototropismo, con vuelo silente y un alcance de vuelo menor de 2 Km ⁵.

1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La leishmaniosis es una enfermedad con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde formas asintomáticas en personas inmunocompetentes, hasta las formas más graves que pueden tener un curso fatal si no son tratadas.

Las formas de presentación clínica más comunes provocadas por *L. infantum* son: la leishmaniosis cutánea (LC), en la que los parásitos quedan aislados en los macrófagos de la zona de la picadura debido a la instauración de una fuerte respuesta inmune de tipo celular, y la leishmaniosis visceral (LV), en la que los parásitos se diseminan a órganos internos por circulación linfática o sanguínea, debido a un fallo de la respuesta de tipo celular ¹. Se han descrito casos aislados de leishmaniosis mucocutánea humana asociada a pacientes inmunodeprimidos producidos por la presencia de *Leishmania* en la mucosa respiratoria o digestiva. Otras formas de presentación de la leishmaniosis, como la forma post-kala azar, no se asocian a *L. infantum* ⁷.

Las lesiones se pueden curar de forma espontánea, excepto la forma difusa, y pueden presentarse recaídas después del tratamiento. *Leishmania* pertenece al grupo de parásitos oportunistas, detectándose un gran número de casos de coinfección Leishmaniosis-Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), fundamentalmente en los países del área mediterránea ¹.

2. OBJETIVOS

- Definir la situación de la leishmaniosis en la Comunidad de Madrid antes, durante y posteriormente al brote epidémico de leishmaniosis sufrido en la zona suroeste en el año 2010.
- Identificar los factores de riesgo condicionantes de la transmisión de la enfermedad, como el estudio del vector y reservorio, o los cambios geográficos y medioambientales sufridos en el área afectada.
- Reflejar la importancia que tienen la vigilancia entomológica y la aplicación de las técnicas moleculares de detección de *Leishmania* en flebotomos en el control de la leishmaniosis.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica mediante la búsqueda, principalmente, de revistas y artículos científicos en bases de datos como Google Scholar y PUBMED.

Se ha prestado especial atención a las publicaciones que describían la evolución del brote de leishmaniosis en el suroeste de la Comunidad de Madrid y las medidas adoptadas para su detección y erradicación, así como la evolución posterior de la enfermedad. En especial, los artículos científicos publicados por el equipo investigador del Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII y el libro “Brote de Leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios”.

El criterio establecido para la elección de los artículos fue, en primer lugar, la relevancia de estos, seguido del año de publicación. Las palabras más empleadas para la búsqueda fueron: *Leishmania infantum*, *Phlebotomus perniciosus*, reservorio, leishmaniosis, Comunidad de Madrid.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SITUACIÓN DE LA LEISHMANIOSIS EN ESPAÑA

En los últimos años, la extensión e incidencia de la leishmaniosis se ha incrementado como consecuencia de factores como el cambio climático, las transformaciones ambientales, las migraciones masivas y las condiciones de inmunosupresión.

En España, la leishmaniosis es una enfermedad esencialmente zoonótica en el que el perro es considerado el principal reservorio y que está distribuida por todo el territorio peninsular e Islas Baleares, aunque su mayor incidencia se da en el litoral mediterráneo y en la meseta central. Es provocada por la especie *L. infantum* y transmitida gracias a la participación de dos vectores, *P. perniciosus* y *P. ariasi*, cuya densidad de población es mayor en zonas periurbanas que en las rurales, debido a los cambios ambientales provocados por el acercamiento a un modelo urbanístico y a los movimientos poblacionales producidos en los últimos años^{2,6}.

En nuestro país la leishmaniosis puede seguir tres patrones de presentación: 1) endémico, los casos de enfermedad son esporádicos y el perro es el principal reservorio; 2) casos asociados a situaciones de inmunodepresión como la coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y 3) brotes epidémicos. La tasa de hospitalización debido a esta enfermedad en España es de 0'41/100.000 habitantes, siendo la mayoría de los casos de personas inmunocompetentes a niños menores de 5 años, mientras que la incidencia nacional media por año notificada hasta el 2011 era de 0'45 casos/100.000 habitantes. Gracias a la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) para el tratamiento de VIH, el número de casos por coinfección disminuyó significativamente a finales de los años noventa. No obstante, este virus sigue siendo un factor de riesgo en el desarrollo de la LV ya que la terapia TARGA no consigue reestablecer completamente la inmunidad del individuo ^{8,9}.

En España, la leishmaniosis ha sido una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) a nivel nacional desde 1982 hasta 1996, periodo en el que se registraron 1.574 casos. Más adelante, el RD 2210/1995 por el que se fundó la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) siguió considerando a la leishmaniosis como una EDO, pero su notificación pasó a ser de ámbito regional, y dejó de notificarse en aquellas Comunidades Autónomas en las que la enfermedad no se consideraba endémica. A partir de este momento era necesario consultar registros como el Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) del Sistema Nacional de Salud, elemento esencial de los sistemas de información de la actividad asistencial hospitalaria que está aportando información más realista sobre la incidencia de la leishmaniosis. Entre los años 1997 y 2011 tuvieron lugar 8.010 hospitalizaciones relacionadas con la leishmaniosis según un estudio retrospectivo, entre los cuales 3.442 presentaban la enfermedad como primer diagnóstico y no como una asociación con una inmunodepresión como era habitual en las coinfecciones de VIH ^{9,10}.

La mayor parte de los casos reportados al CBMD pertenecen a formas viscerales de la enfermedad (82'6%), ya que esta requiere hospitalización para su tratamiento, mientras que las formas cutáneas se atienden y tratan fundamentalmente de forma ambulatoria. Sin embargo, se cree que existe una subdeclaración del 25%-40% para la LV, y de casi el 100% para los casos de LC. Como consecuencia del aumento de casos de los últimos años y la información actualizada sobre la incidencia, extensión y distribución real de la enfermedad, la leishmaniosis ha sido incluida de nuevo como EDO en todas las Comunidades Autónomas ^{10,11}.

4.2. SITUACIÓN DE LA LEISHMANIOSIS EN LA COMUNIDAD DE MADRID

En la primera década del siglo XXI el número de casos anuales de leishmaniosis notificados en la Comunidad de Madrid (CM) se mostraba estable, pero en el último trimestre de 2010 se detectó un aumento inusual del número de casos, cuyo inicio parecía tener origen en julio de 2009. Los estudios epidemiológicos indicaron que dicho incremento se concentraba en la región del suroeste de la CM, en particular, en los municipios de Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid, lo que constituyó un brote de leishmaniosis en esta zona. El municipio más afectado fue, con diferencia, Fuenlabrada.

Tras la detección del brote, en el análisis de los casos de leishmaniosis notificados en la CM se incluye la comparación de las características epidemiológicas de los casos asociados al brote con el resto de los casos notificados en el territorio. Por ello, se llevó a cabo un estudio descriptivo en el periodo 2009-2014 que comparaba los casos de leishmaniosis visceral asociados al brote con los esporádicos notificados en la CM (Ver Figura 2). Durante las 5 temporadas epidemiológicas analizadas, se notificaron en la CM 757 casos de leishmaniosis, 584 asociados al brote de la zona suroeste y 173 casos esporádicos, distribuidos en el resto de la CM. De ellos, 346 son leishmaniosis viscerales, 222 casos asociados al brote del suroeste y 124 casos esporádicos del resto de la CM^{12,13}.

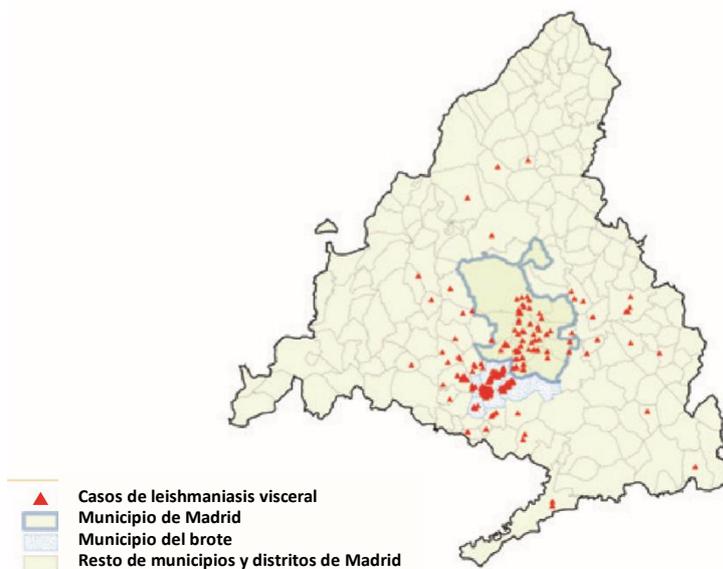


Figura 2. Distribución de los casos de leishmaniosis visceral según ubicación de su domicilio. Comunidad de Madrid, 2009-2014¹².

Los resultados mostraron que la leishmaniosis visceral era más frecuente en hombres (70% de los casos) tanto en los asociados al brote como en los esporádicos. En ambos grupos la distribución por edad fue similar, pero se encontraron diferencias respecto al país de nacimiento, en los casos asociados al brote se observó un mayor porcentaje de individuos de origen subsahariano. Además, se encontraron diferencias en el porcentaje de casos con factores de riesgo intrínsecos, que fue menor en los casos asociados al brote. La incidencia media anual de casos de leishmaniosis asociados al brote epidémico fue 18'52 veces mayor que la de casos esporádicos en el resto de la CM (7'77/100.000 hab. frente a 0'42/100.000 hab.)¹².

En los años previos al brote, la tasa de incidencia en la zona afectada se situaba en 1'3 casos por 100.000 habitantes. Desde 2009 hasta diciembre de 2019 se han notificado un total de 781 casos de leishmaniosis en la zona del brote comunitario (589 casos en el municipio de Fuenlabrada), correspondiendo el 38'7% con leishmaniosis visceral y el 61'3% con la forma cutánea (Ver Figura 3, datos proporcionados por la Comunidad de Madrid). Solo en el municipio de Fuenlabrada la incidencia en 2011 se situó en 99'2 casos/100.000 hab. y en 2019 pasó a situarse en 4'9 casos/100.000 hab.¹⁴.

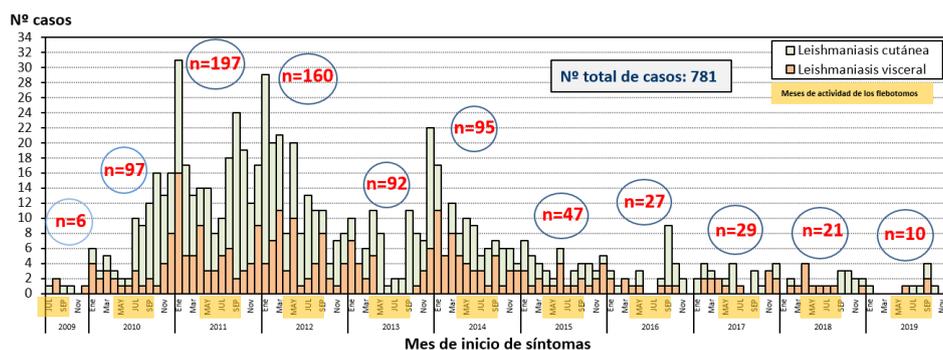


Figura 3. Distribución mensual de casos de leishmaniosis en el brote (2009-2019). Datos proporcionados por la Comunidad de Madrid ¹⁴ y modificado por Laboratorio de Entomología Médica.

4.3. VIGILANCIA Y CONTROL DEL VECTOR

La vigilancia entomológica en la zona del brote se ha realizado desde sus inicios por el Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII mediante muestreos intensivos (en cuatro estaciones), con el apoyo de Técnicos de la Subdirección General de Sanidad Ambiental que participa en muestreos extensivos (en estaciones de muestreos repartidas en los cuatro municipios afectados) y que se realizan en la temporada activa de los flebotomos, de mayo-junio a septiembre-octubre dependiendo de las condiciones climáticas.

La investigación entomológica intensiva, durante el periodo de 2012 a 2014, se llevó a cabo en 4 estaciones ubicadas cerca de las áreas afectadas. Tres de ellas se situaron en la zona limítrofe del parque con el municipio de Fuenlabrada, denominadas ATE, BOS y JIC, con un hábitat ideal para los conejos, y la cuarta, se colocó dentro del parque perteneciente al municipio de Leganés, llamada POL, donde las liebres eran predominantes. La ubicación de las cuatro estaciones se seleccionó de acuerdo con un estudio publicado en 2011 y el éxito previo de captura de flebotomos que se obtuvo de esas zonas. En el proyecto, se colocaron mensualmente veinte trampas adhesivas (hojas de papel de 20 x 20 cm impregnadas en aceite de ricino) y dos trampas de luz CDC, durante dos días consecutivos, en cada estación. Las trampas de luz (LT) eran reemplazadas todas las mañanas y las hembras de flebotomos que se capturaron vivas en ellas sirvieron para determinar la tasa de infección de *L. infantum* en el vector mediante la disección y extracción del tubo digestivo de estas. Durante el periodo de estudio, un total de 3.203 hembras de *P. perniciosus* fueron diseccionadas, obteniendo una tasa de infección global de 3'65%. En 2012, 19 de las 735 hembras de flebotomos estaban infectadas con promastigotes de *L. infantum* (2'6%). En 2013, 57 de las 864 hembras de flebotomos diseccionadas estaban infectadas (6'6%). Y en 2014, en 41 de las 1.604 hembras de flebotomos diseccionadas se encontraron promastigotes (2'6%).

En las capturas con trampas adhesivas se identificaron cuatro especies de flebotomos: *P. perniciosus* (75'34 %), *P. sergenti* (0'005 %), *P. papatasi* (0'005 %) y *Sergentomyia minuta* (24'65 %). Los resultados mostraron una densidad muy elevada de la especie *P. perniciosus*, 193'6 por m². Las capturas con trampas de luz mostraron un claro predominio de *P. perniciosus*, mostrando un pico máximo en agosto en 2012 y otro en septiembre en los años 2013 y 2014 ^{15,16}.

La vigilancia del vector incluye el muestreo extensivo en los cuatro municipios afectados. En la figura 4A se muestra la ubicación de las estaciones y puntos de muestreo de trampas adhesivas y de luz en el año 2013. Su localización se basa fundamentalmente en dos tipos de criterios: la cercanía a los casos de leishmaniosis humana, en particular aquellos que hubieran afectado a niños menores de 2 años y a personas mayores de 70 años, y otro, la existencia de lugares adecuados para la presencia del vector (áreas con abundantes reservorios, parques y otras áreas especialmente frecuentadas).

En la figura 4B se muestra un mapa con las densidades de *P. perniciosus* obtenidas en 2014. Se observa que el parque Polvoranca y el Arroyo Culebro en el municipio de Leganés, Bosque Sur en Fuenlabrada y el parque de la Alhóndiga en Getafe, son las áreas de mayor presencia del vector ¹⁶.

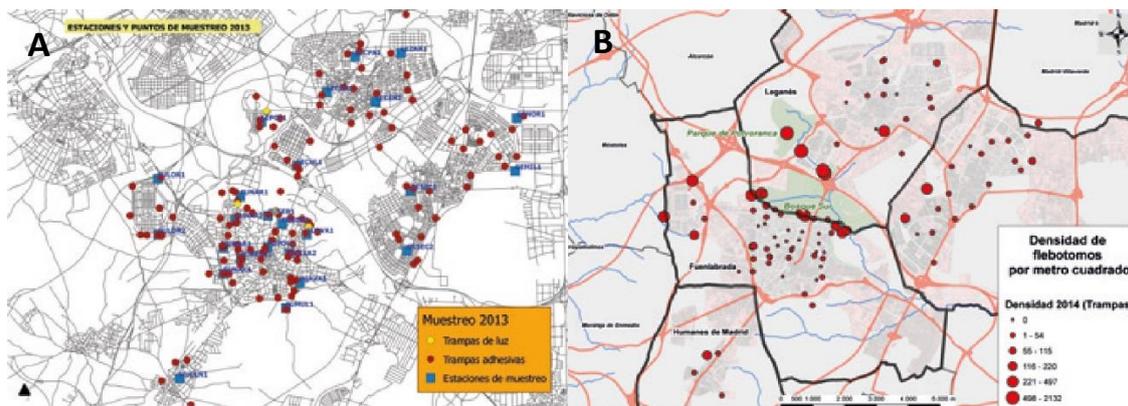


Figura 4. A. Ubicación de las estaciones y puntos de muestreo de trampas adhesivas y de luz y **B.** Densidad de *Phlebotomus perniciosus*. Muestreo trampas adhesivas ¹⁶.

Para una mejor comprensión de la epidemiología del brote, se realizaron procedimientos moleculares para la detección de *L. infantum* y la determinación de preferencias alimentarias de las hembras hematófagas por los posibles vertebrados implicados que se explican más adelante.

4.4. RESERVORIO: DOMÉSTICO Y SILVESTRE

En cuanto a los posibles reservorios domésticos, el perro, reservorio clásico de la leishmaniosis en España, está muy presente en la zona afectada. Sin embargo, los estudios de seroprevalencia y detección molecular de *L. infantum* realizados en perros revelaron que estos no estaban involucrados de una manera determinante en la transmisión del parásito en el brote ¹⁷. Este hallazgo desencadenó la búsqueda de otros reservorios potenciales que pudieran estar implicados, y como consecuencia, se demostró que mamíferos silvestres, como las liebres y conejos capturados en la zona, eran capaces transmitir el parásito a los flebotomos ^{18,19}.

Xenodiagnóstico

Para el estudio de la implicación de liebres y conejos como reservorios de *L. infantum*, se empleó un procedimiento específico denominado xenodiagnóstico directo (Ver

Figura 5), en el que se utilizaron hembras de *P. perniciosus* procedentes de una colonia establecida en el laboratorio de Entomología Médica ²⁰.

Esta metodología consistió en la exposición de lagomorfos, liebres (*Lepus granatensis*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*) procedentes del foco, previamente anestesiados, a la picadura de las hembras de flebotomos, una vez alimentadas eran separadas y llevadas al laboratorio. Tras unos 5-6 días de la alimentación, se procedía a la disección y extracción del tubo digestivo para comprobar la presencia de *L. infantum*.

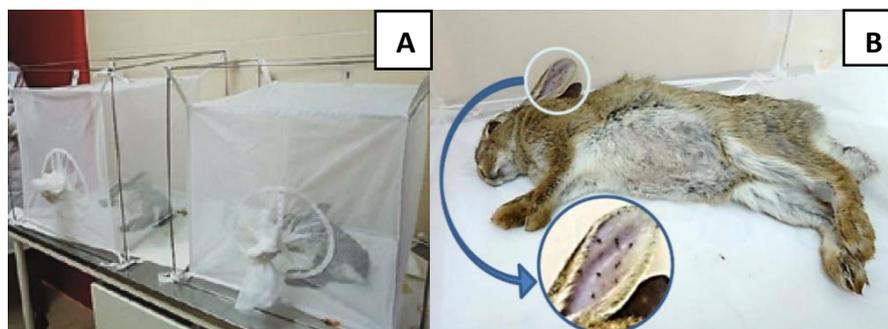


Figura 5. Xenodiagnóstico de la leishmaniosis en conejos (A) y liebres (B). Fuente: Laboratorio de Entomología Médica, ISCIII ^{18,19}.

Los resultados obtenidos demostraron la existencia del parásito en *P. perniciosus*, por lo que se confirmó la capacidad de los lepidóridos de transmitir *L. infantum* a las hembras de flebotomos. Se confirmó así, su implicación como reservorios silvestres en el brote de leishmaniosis en la región suroeste de la Comunidad de Madrid ^{18,19,21}.

4.5. GESTIÓN INICIAL DEL BROTE EPIDÉMICO DE LEISHMANIOSIS Y PLAN DE MEDIDAS DE CONTROL

Después de detectar el aumento del número de casos de la enfermedad en el año 2010, se iniciaron una serie de medidas ambientales destinadas a investigar y controlar el brote epidémico de leishmaniosis. El Servicio de Sanidad Ambiental de la Consejería de Sanidad del que forman parte los técnicos responsables de zoonosis de salud pública junto con los expertos en enfermedades de transmisión vectorial aunaron esfuerzos para dar una explicación a la causa de aparición del brote ^{13,22}.

Entre las medidas de control adoptadas inicialmente, se encontraba la vigilancia del vector por medio de su captura con trampas de luz CDC (procedimiento explicado anteriormente). En el estudio del vector realizado en 2011 en la zona afectada se identificó un predominio de *P. perniciosus*, además de detectar valores elevados de densidad del flebotomo (45'3 flebotomos/m², frente a la media de la Comunidad de Madrid, 30 flebotomos/m²). También se determinó la presencia de *L. infantum* en más del 90% de los casos de leishmaniosis confirmados ¹⁶.

La Dirección General de Medio Ambiente, junto con la coordinación de los municipios afectados, puso en marcha un plan de lucha antivectorial con el objetivo de continuar con la vigilancia y control del flebotomo. Este incluía, además de muestreos entomológicos anuales de mayo a octubre, la desinsectación en las zonas de riesgo declaradas y sus áreas más cercanas, en lugares determinados como parques de aguas

pluviales, alcantarillado, vertederos, escombreras o taludes. Además, se hizo uso de insecticidas biológicos para llevar a cabo dicho control ¹⁰.

Las modificaciones y planificación urbana de la zona a lo largo de los años para la creación del parque Bosque Sur con fines recreativos, fueron los causantes del paso de un medio rural a uno más urbano, lo que supuso, junto con la ausencia de depredadores en la zona, que la población de lepóridos aumentara de forma significativa. Para el control del brote ha sido necesario la limitación de estos reservorios mediante su captura y destrucción de madrigueras. Junto con este proyecto, también se tomaron medidas ambientales, que consistían en la retirada de maleza y restos vegetales en parques y parcelas, limpieza de alcantarillado y eliminación de lodos en las zonas de riesgo ^{13,23}.

Tanto la Consejería de Sanidad como los Ayuntamientos implicados, realizaron una campaña de difusión de información y educación sanitaria que fue dirigida tanto a los profesionales, como a los ciudadanos. En ella, se incluía el protocolo de vigilancia y las características más relevantes de la enfermedad, para intentar conseguir un diagnóstico diferencial por parte de los médicos de atención primaria. Además, se centró en conseguir una máxima difusión de información sobre medidas preventivas. Se repartieron folletos a la población que explicaban cómo evitar la picadura del flebotomo: alejarse de zonas de riesgo como los parques limítrofes a las áreas urbanas, no permanecer al aire libre en el crepúsculo y el anochecer en esos lugares, vestirse con ropa de tejido grueso, holgada y de manga larga, así como pantalones largos, uso de repelentes en la ropa y la colocación de mosquiteras en puertas y ventanas de las viviendas ²³.

4.6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS

En la actualidad, los procedimientos basados en el análisis del ADN del parásito son el principal método de diagnóstico y caracterización molecular debido a su alta sensibilidad. Normalmente, estas técnicas se basan en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII ha contribuido con los estudios de detección de *Leishmania* en las hembras de flebotomos capturadas en la zona del brote tanto con trampas adhesivas como de luz tipo CDC, el estudio de las preferencias alimentarias de las hembras de flebotomos capturadas con sangre en el tubo digestivo, así como la caracterización molecular de los aislados de *L. infantum* obtenidos mediante disección de las hembras capturadas vivas mediante trampas CDC ²⁴.

Detección de *Leishmania* spp. en *Phlebotomus perniciosus*

La detección de ADN de *L. infantum* en las hembras de flebotomos capturadas fue realizada por medio de tres protocolos de PCR convencional que amplifican distintas dianas: un fragmento de 120 pb del ADNk, un fragmento de 702 pb del gen *cpb* y un fragmento de 300-350 pb de la región ITS1. De las 912 hembras de *P. perniciosus* analizadas, 308 presentaron sangre en su tubo digestivo, y de ese total, 88 presentaban

L. infantum (9'65%). El porcentaje de hembras de flebotomos infectadas fue mayor entre las hembras con sangre (13'31%) que entre las hembras sin sangre (7'78%)⁶.

Es importante destacar que la existencia del parásito en el flebotomo solo se confirma una vez realizada la disección del vector y posterior observación microscópica de promastigotes en la porción anterior del aparato digestivo del artrópodo, técnica que requiere tiempo y alto grado de formación por parte del profesional que lo realiza.

Por tanto, los métodos moleculares son de gran ayuda siempre que se efectúen adecuadamente, es decir, con un número elevado de muestras y sobre los ejemplares apropiados. La detección de ADN de *Leishmania* en hembras de flebotomo sin sangre correspondería a parásitos que han resistido el proceso de digestión de la sangre, confirmando la viabilidad y transmisión del parásito¹⁵.

Detección de la carga parasitaria de *P. perniciosus* mediante qPCR

Los estudios realizados han proporcionado la posibilidad de identificar tanto las preferencias alimentarias de los flebotomos como la detección molecular de *L. infantum* en el vector competente, pero ninguna pudo determinar la carga parasitaria. Por ello, se llevó a cabo otro estudio en el que se optimizaba la PCR convencional a una a tiempo real (qPCR). Este consistía en la estimación de la carga parasitaria de *Leishmania* en *P. perniciosus*, realizando una comparación entre hembras de flebotomos que poseían sangre, o no, en su aparato digestivo. Los resultados mostraron que el 70% de las hembras de flebotomos analizadas en el área afectada del suroeste de la Comunidad de Madrid, presentaban una alta carga parasitaria de *L. infantum* en sus tubos digestivos y que, el 16'17% de estos, albergaban valores mayores de 100.000 parásitos/por reacción de qPCR²⁵.

Determinación de las preferencias alimentarias

La identificación de los posibles reservorios implicados en el foco de infección fue crucial para la elección de las medidas de control. El empleo de técnicas serológicas como ELISA eran la primera aproximación para el estudio de la sangre ingerida. Pero fueron reemplazadas por las técnicas moleculares, pues presentaban una serie de limitaciones, principalmente, su menor precisión, la necesidad de producir anticuerpos específicos contra los posibles reservorios y requerir flebotomos frescos y recién alimentados^{15,26}.

El origen de la sangre ingerida por las hembras de flebotomo capturadas en la zona del brote se llevó a cabo mediante PCR amplificando un fragmento de 359 pb de la región conservada del gen *cyt b*, presente en el ADN mitocondrial de los vertebrados estudiados y posterior secuenciación y análisis de las secuencias obtenidas. En la PCR-RFLP se utilizaron las endonucleasas de restricción *HaeIII* y *HinfI*, que generaron patrones específicos para la identificación del origen de la sangre ingerida por las hembras de flebotomos, pudiendo establecer así sus preferencias alimentarias²⁶.

Diversos estudios han demostrado que *P. perniciosus*, el principal vector de *L. infantum* en España, no tiene una preferencia alimentaria definida por un hospedador a la hora de ingerir sangre, sino que este, es oportunista, es decir; su fuente de alimentación está condicionada por el hábitat y los vertebrados disponibles que se encuentren en él¹⁵.

Caracterización de los aislados de *Leishmania* spp

Para la identificación de los promastigotes aislados se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de las regiones transcritas internas de los genes ribosomales ITS1 e ITS2. Los aislados obtenidos mediante la disección de las hembras de flebotomo capturadas se caracterizaron como *L. infantum* genotipo ITS-Lombardi, el mismo que fue identificado en los aislados de los estudios de xenodiagnóstico directo realizados en liebres y conejos capturados en el área del brote ^{18,19}.

Curiosamente, el 70% de los casos de leishmaniosis se encontraron en pacientes inmunocompetentes. Por ello, se quiso determinar la virulencia del genotipo de *L. infantum* implicado en el brote mediante estudios de infección ex vivo e in vivo empleando un modelo de transmisión natural. En estas investigaciones, se trabajó con aislados de *L. infantum* (BOS1FL1, POL2FL6 y POL2FL7) obtenidos de hembras de *P. perniciosus* capturados en la zona afectada, que indicaron una alta virulencia del genotipo ITS-Lombardi teniendo en cuenta el índice de infección, la producción de citoquinas (IL-12p40 e IL-10) y la actividad de enzimas (NO y arginasa) involucrados en la leishmaniosis visceral ^{27,28}.

Todo esto, podría explicar la facilidad de *Leishmania* para parasitar individuos inmunocompetentes, aunque es importante seguir investigando y profundizar para conseguir una mejor comprensión del tema. En este sentido, se ha estudiado recientemente el papel que podrían jugar en la transmisión los sujetos asintomáticos y sintomáticos, así como inmunodeprimidos que pudieran actuar como reservorios de *Leishmania* en la zona del brote mediante estudios de xenodiagnóstico indirecto. Los resultados mostraron que los pacientes inmunodeprimidos con LV eran los principales reservorios humanos a la hora de transmitir *L. infantum* a las hembras de flebotomos. En segunda posición se encontraban los pacientes inmunocompetentes con LV, puesto que solo algunos de ellos fueron capaces de transmitir el parásito al vector competente. En último lugar, estaban los sujetos asintomáticos y los pacientes inmunocompetentes en tratamiento por leishmaniosis, ya que, ninguno de ellos fue capaz de infectar a las hembras de *P. perniciosus*. Por ello, se prestó especial atención a los pacientes coinfectados VIH/*L. infantum*, y dentro de este grupo, a los sujetos asintomáticos, pues se observó que eran susceptibles de ser reservorios de *Leishmania* durante largos periodos de tiempo, aun estando bajo tratamiento profiláctico contra la leishmaniosis ²⁹.

4.7. EVOLUCIÓN Y ANÁLISIS ESPACIAL DE LOS CASOS DE LEISHMANIOSIS

En el periodo 2009-2013 se llevó a cabo un estudio con el objetivo de realizar un análisis espacial de los elementos claves del ciclo de la leishmaniosis, vectores, reservorios y casos humanos en el brote comunitario declarado en el suroeste de la Comunidad de Madrid. En los cuatro municipios afectados, Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid, la mayor parte de los casos de leishmaniosis se localizaron en el norte de Fuenlabrada. Se pudo observar que la distribución de las infraestructuras viarias y el cambio producido en el suelo jugaban un papel fundamental en el desarrollo y expansión de la enfermedad (Ver Figura 6).

Se georeferenciaron 485 casos de leishmaniosis, declarados en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid, con los que se observó que la zona de mayor concentración de casos de la enfermedad coincidía espacialmente con áreas residenciales limítrofes a amplios espacios verdes de reciente creación (Parque forestal Bosque sur) con una alta densidad de flebotomos y una elevada prevalencia de leishmaniosis en lepóridos, así como la ausencia de barreras territoriales. La presencia de una densa red de comunicaciones ha contribuido a generar las condiciones ideales para el desarrollo de hábitats idóneos tanto para el vector como para los reservorios, lo que ha llevado a la aparición y estabilización de un nuevo ciclo urbano para la proliferación de *Leishmania*.

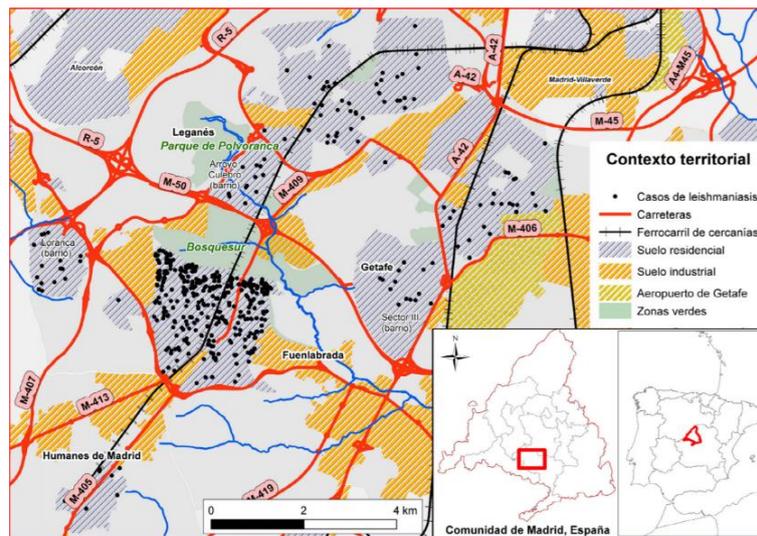


Figura 6. Distribución de casos en toda la zona y principales determinantes territoriales 30 .

Las barreras territoriales que componen las autovías de varios carriles parecían proteger a las poblaciones que estaban cerca de zonas con esas características, pues supone una barrera ancha y agitada por el tráfico, inhóspita para el tránsito de reservorios y vectores. Sin embargo, parece que el trazado del ferrocarril de cercanías jugó el papel contrario actuando como vía de penetración del ciclo de la enfermedad en el interior del casco urbano de Fuenlabrada 30 .

La vigilancia epidemiológica no solo debe realizarse en los municipios donde se originó el brote, sino también en zonas cercanas que puedan reproducir las condiciones adecuadas para la transmisión de la enfermedad y con la posibilidad de generar un nuevo brote comunitario. Por ello, se procedió al estudio, desde 2001 a 2017, del área 10 de Salud Pública de la Comunidad de Madrid (Figura 7), donde se observó un aumento del número de casos en las zonas rurales adyacentes, con características ambientales similares a las del foco de infección.

La información de los casos declarados fue recopilada gracias a la Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid en la zona de estudio y, además, se contrastaron las tasas de incidencia con las del brote. Las notificaciones recogidas procedían generalmente de hospitales del área de población de estudio, denominada Distrito D1 (D1), que incluye dos zonas diferenciadas: la más urbana y cercana a Madrid,

compuesta por los municipios de Parla y Pinto, y otra más rural y alejada, que incluye 7 municipios (Batres, Casarrubuelos, Cubas de la Sagra, Serranillos del Valle, Torrejón de Velasco, Torrejón de la Calzada y Griñón).

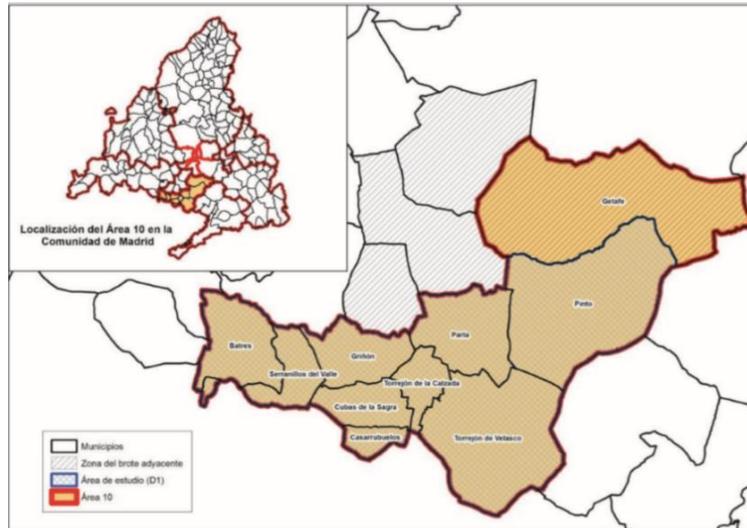


Figura 7. Mapa de localización de las áreas de interés. Fuente: SIGIS. Dirección General de Salud Pública. Comunidad de Madrid ³¹.

Se llevó a cabo un análisis espacial de los casos y de los conglomerados (clusters) para cuatro unidades espaciales. A pesar del bajo número de casos en la zona de estudio, los examinados en el Distrito 1 superaron a los esperados tras el inicio del brote, con un índice epidémico de 7'8 en 2013. La distribución espacial de los casos estuvo muy relacionada con la ampliación del suelo urbano, donde se acumuló el mayor número de casos. Cuando se analizó el número de casos por secciones censales y por cuadrículas se mostró una alta autocorrelación espacial entre ellos. Se realizó un análisis de los puntos calientes (cuadrículas con tasas altas), que reveló una mayor incidencia en la zona D1 en el periodo posterior al brote, específicamente en la Zona Básica de Salud de Griñón (ZBS). Se confirmó una relación espacial entre casos y zonas de mayor presencia de leptóridos y vectores.

Los resultados obtenidos en el estudio sugieren una relación entre el brote comunitario y el incremento de casos en el área de estudio, en particular, en la zona rural, ya que comparten muchas de las características medioambientales y ecológicas como la transformación de más de un 50% de uso del suelo de rural a urbano que hizo que un gran número de viviendas se pusieran en contacto con el medio agrícola, y con ello con los flebotomos y reservorios. Por lo que, para tratar de limitar la extensión a modo de onda del brote, sería necesario reforzar la vigilancia y aplicar las medidas de control que fueron efectivas en la gestión de este ³¹.

5. CONCLUSIONES

- Gracias a la actuación coordinada del Servicio de Sanidad Ambiental de la Comunidad de Madrid y el Laboratorio de Entomología Médica del Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, se ha conseguido disminuir el número de casos de la enfermedad en la zona afectada por el brote y alrededores, puesto que han sido clave en la identificación de las medidas de control y prevención adecuadas para su gestión.
- La participación activa de nuevos reservorios, liebres y conejos, en la transmisión de *Leishmania infantum*, en el brote del suroeste de la Comunidad de Madrid, fue demostrada gracias al estudio de xenodiagnóstico directo realizado por el Laboratorio de Entomología Médica del ISCIII, que demostró la existencia de un ciclo silvestre mantenido por liebres y conejos junto con un ciclo doméstico, con el perro como principal reservorio.
- Los estudios moleculares basados en PCR fueron cruciales en la detección de ADN de *L. infantum* en el vector responsable del brote, *P. perniciosus*, así como la identificación de las preferencias alimentarias de los flebotomos mediante amplificación de un fragmento del *cyt b* y la determinación de la carga parasitaria mediante qPCR (a tiempo real), respectivamente. También se realizaron estudios acerca de la alta virulencia que posee el genotipo ITS-Lombardi de *L. infantum*, lo que ha permitido explicar la elevada capacidad que tiene de parasitar a individuos inmunocompetentes.
- El análisis espacial, realizado mediante el Sistema de Información Geográfica de Indicadores de Salud de la Comunidad de Madrid (SIGIS), ha permitido descubrir patrones específicos de la enfermedad que son vitales en la vigilancia, prevención y control del brote y continúa siendo de utilidad en la evolución del mismo. Esta herramienta de estudio ayuda a la comprensión del origen y evolución de los brotes en las enfermedades infecciosas, así como en el diseño de intervenciones ambientales.
- Para poder limitar la extensión del brote y llegar a la eliminación del riesgo que presenta la leishmaniosis en la Comunidad de Madrid, se elaboró un plan de vigilancia integral y multisectorial en el que participaron todas las instituciones implicadas en la preparación y respuesta de los sectores de salud humana, animal y ambiental desde el nivel local al ámbito nacional. Las medidas de vigilancia adoptadas fueron eficaces en el control del brote de leishmaniosis situando el número de casos en el año 2019, en cifras similares a las de antes del brote (2009).

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27(5):305-18.
2. World Health Organization. Control of Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. [Internet]. Geneva: 2010. [Consultado 2020]. Disponible en: file:///C:/Users/ana_o/Desktop/tfg/WHO%20control%20leishmaniasis%202010.pdf
3. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases [Internet]. 2013. [Consultado 2020]. Disponible en: https://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/
4. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): e1003594.
5. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolos de enfermedades de declaración obligatoria. [Internet]. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III; 2013. [Consultado 2020]. Disponible en: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/07/2015-28724e36ba>
6. González E. Estudios entomológicos en el foco de leishmaniosis del suroeste de la Comunidad de Madrid. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid; 2019.
7. San Martín JV, Ruiz JM, Molina L, Horrillo L, Matía B, Castro A et al. Leishmaniasis visceral en el municipio de Fuenlabrada. En: Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid); Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid; 2017. p. 135-137.
8. Gil-Prieto R, Walter S, Alvar J, Gil de Miguel A. Epidemiology of Leishmaniasis in Spain Based on Hospitalization Records (1997–2008). *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85(5): 820–825.
9. Herrador Z, Gherasim A, Jiménez BC, Granados M, San Martín JV, Aparicio P. Epidemiological Changes in Leishmaniasis in Spain According to Hospitalization-Based Records, 1997–2011: Raising Awareness towards Leishmaniasis in Non-HIV Patients. *PLOS Negl Trop Dis.* 2015; 9(3): e0003594.
10. Suárez B, Isidoro B, Santos S, Sierra MJ, Molina R, Astray J et al. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Pública.* 2012; 86(6): 555-564.
11. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Boletín oficial del estado. Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, 2015. 24012-24015.

12. Ordobás M, Arce A, Estirado A, Moratilla L, García N, Pérez MA et al. Situación de la leishmaniasis en la Comunidad de Madrid. En: Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid); Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid; 2017. p. 99-104
13. Arce A, Estirado A, Ordobás M, Sevilla S, García N, Moratilla L et al. Reemergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Euro Surveill. 2013; 18(30): 1-9.
14. Arce A, Estirado A, Ordobás M, Moratilla L, García N, Pérez MA et al. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid: detección e investigación epidemiológica. En: Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid); Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid; 2017. p. 105-112.
15. González E, Jiménez M, Hernández S, Martín-Martín I, Molina R. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. Parasit Vectors. 2017; 10(1): 368.
16. Iriso A, Tello A, González-Mora D, Vázquez MA, Molina R, Jiménez M. Control del vector. En: Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid); Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid; 2017. p. 177-190.
17. Miró G, Müller A, Montoya A, Checa R, Marino V, Marino E et al. Epidemiological role of dogs since the human leishmaniasis outbreak in Madrid. Parasit Vectors. 2017; 10:209.
18. Molina R, Jiménez M, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet Parasitol. 2012; 190: 268-271.
19. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?. Vet Parasitol. 2014; 202: 296-300.
20. Molina R. Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). Res Rev Parasitol. 1991; 51 (1-4): 87-89.
21. Chicharro C, Migueláñez S, Flores M, García E, Ortega S, Fuster F et al. Infección por *Leishmania infantum* en fauna silvestre en el brote de leishmaniasis del área 9 de la Comunidad de Madrid (2011-2014). En: Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid); Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel

de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid; 2017. p. 203-211.

22. Vilas F, Fúster F. Gestión del brote de leishmaniosis. En: Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid); Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Brote de leishmaniosis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid; 2017. p. 55-63.

23. Pérez F, Montilla M, Muñoz F. Brote de Leishmaniosis en la Comunidad Autónoma de Madrid. Importancia de las medidas de prevención. Enfermería Global. 2016; 15 (1): 361-374.

24. Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fúster F et al. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniosis in Madrid, Spain. Parasitol Res. 2013; 112: 2453-2459.

25. González E, Álvarez A, Ruiz S, Molina R, Jiménez M. Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniosis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR. Acta Tropica. 2017; 171: 68-73.

26. González E, Gállego M, Molina R, Abras A, Alcover M.M, Ballart C et al. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. Acta Tropica. 2015; 152: 96-102.

27. 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.

28. Martín-Martín I, Jiménez M, González E, Eguiluz C, Molina, R. Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniosis outbreak in Madrid, Spain. Vet Res. 2015; 46: 138.

29. Molina R, Jiménez M, García-Martínez J, San Martín JV, Carrillo E, Sánchez C et al. Role of asymptomatic and symptomatic humans as reservoirs of visceral leishmaniosis in a Mediterranean context. PLoS Negl Trop Dis. 2020; 14(4): e0008253.

30. Aránguez E, Arce A, Moratilla L, Estirado A, Iriso A, De la Fuente S et al. Análisis espacial de un brote de leishmaniosis en el sur del Área metropolitana de la Comunidad de Madrid. 2009-2013. Rev Salud Ambient. 2014; 14(1): 39-53.

31. Olmedo C, Pérez AM, Iriso A, Aránguez E, Abad I. Evolución y análisis espacial de los casos de Leishmaniosis en una zona rural colindante al brote comunitario de Madrid: 2001-2017. Rev Esp Salud Pública. 2018; (92): e201811084.