

**Títol del Treball:**

**Epidemiologia i genètica del brot de leishmaniosi detectat a Madrid  
l'any 2009**

Estudiant: Aurora Román Barrero  
Correu electrònic: aurorarb3773@gmail.com  
Grau en Biologia

Tutora: Alba Abras Feliu  
Correu electrònic: alba.abras@udg.edu

Cotutor: (en cas de places externes)  
Correu electrònic:  
Empresa/Institució:

Data de dipòsit de la memòria a través de la plataforma de TFG: 6/06/2023

**ÍNDEX**

RESUM .....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
REFLEXIONS SOBRE ÈTICA, SOSTENIBILITAT I PERSPECTIVA DE GÈNERE .....	V
1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. Contextualització a la <i>Leishmania</i> i la leishmaniosi .....	1
1.2. El paràsit: <i>Leishmania</i> sp. ....	1
1.2.1. Aspectes generals i taxonomia .....	1
1.2.2. El vector i els reservoris .....	2
1.2.3. Cicle biològic .....	3
1.3. La malaltia: les leishmaniosis .....	4
1.3.1. La leishmaniosi humana .....	4
1.3.2. Diagnòstic, identificació d'espècies i tractament .....	5
1.3.3. Àrea de distribució de la leishmaniosis a escala global .....	6
1.3.4. La leishmaniosi a Espanya .....	7
2. OBJECTIVES .....	7
3. MATERIALS I MÈTODES.....	7
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	7
4.1. Resultats de la cerca bibliogràfica i anàlisi dels articles seleccionats .....	7
4.2. Descripció del brot i epidemiologia .....	13
4.3. Genètica dels aïllats de <i>Leishmania</i> .....	14
4.4. Vectors i reservoris involucrats al brot .....	15
4.5. Confirmació del paper de les llebres com a principal reservori .....	17
4.6. Mesures de prevenció i control aplicades .....	17
5. CONCLUSIONS .....	18
6. AGRAÏMENTS .....	19
7. BIBLIOGRAFIA .....	20

## RESUM

Les leishmaniosis són un conjunt de malalties zoonòtiques causades per diverses espècies de *Leishmania*, un conjunt de protozous paràsits estrictes amb un cicle heteroxè, alternant un hoste invertebrat, que actua com vector, i un hoste vertebrat, generalment mamífer, que pot actuar com a reservori asimptomàtic.

Epidemiològicament, són malalties endèmiques a tots els continents excepte a l'Antàrtida i afecten entre 700.000 i un milió de persones cada any. El seu reservori principal són els gossos i són transmises a través de dípters hematòfags coneguts com a flebotoms. En humans, la infecció pot presentar-se en tres formes en funció de l'espècie de *Leishmania* involucrada: leishmaniosi cutània, mucocutània i visceral. El diagnòstic es fa mitjançant tècniques parasitològiques, moleculars i immunològiques. La tècnica de referència per la taxonomia actual de les leishmànies és l'anàlisi isoenzimàtic (MLEE) tot i que està essent progressivament substituït per mètodes moleculars que són més resolutius. L'any 2009, a la Comunitat de Madrid es va donar un dels majors brots de leishmaniosi en humans reportats fins ara caracteritzat principalment per la presència d'un reservori alternatiu: la llebre (*Lepus granatensis*).

L'objectiu del present treball de final de grau és descriure l'epidemiologia i la genètica d'aquest brot. Per això, es va realitzar una cerca bibliogràfica a la base de dades WOS amb les paraules clau "*Leish*\* AND outbreak AND Madrid" incloent els resultats de les categories: articles, revisions i altres. Un cop llegits els títols i resums, es van seleccionar un total de 18 articles. Mitjançant la lectura de tots ells, es va determinar que el protozou involucrat en el brot va ser *Leishmania infantum*, transmès a través del vector *Phlebotomus perniciosus*. Els principals municipis afectats van ser Fuenlabrada, Getafe i Leganés, tots ells localitzats als voltants del parc de Bosque Sur. Les manifestacions clíniques dels afectats van ser tan cutànies com visceral. Les obres realitzades a la carretera M-407 van ser les responsables d'un canvi en les dinàmiques de transmissió de *L. infantum*, el que juntament amb la inauguració del parc Bosque Sur el 2007, va generar les condicions ideals per a la reproducció del principal reservori, les llebres, donant lloc al brot de la Comunitat de Madrid del 2009.

## RESUMEN

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades zoonóticas causadas por diversas especies de *Leishmania*, un conjunto de protozoos parásitos estrictos con un ciclo heteroxeno, alternando un huésped invertebrado, que actúa como vector, y un huésped vertebrado, generalmente mamífero, que pueden actuar como reservorio asintomático.

Epidemiológicamente, son enfermedades endémicas en todos los continentes excepto en la Antártida y afectan a entre 700.000 y un millón de personas cada año. Su reservorio principal son los perros y son transmitidas a través de dípteros hematófagos conocidos como flebotomos. En humanos, la infección puede presentarse en tres formas en función de la especie de *Leishmania* involucrada: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. El diagnóstico se realiza mediante técnicas parasitológicas, moleculares e inmunológicas. La técnica de referencia para la taxonomía actual de las leishmanias es el análisis isoenzimático (MLEE) aunque está siendo progresivamente sustituido por métodos moleculares que son más resolutivos. En 2009, en la Comunidad de Madrid se dio uno de los mayores brotes de leishmaniasis en humanos reportados hasta ahora, caracterizado principalmente por la presencia de un reservorio alternativo: la liebre (*Lepus granatensis*).

El objetivo del presente trabajo de fin de grado es describir la epidemiología y la genética de este brote. Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos WOS con las palabras clave "*Leish\** AND outbreak AND Madrid" incluyendo los resultados de las categorías: artículos, revisiones y otros. Una vez leídos los títulos y resúmenes, se seleccionaron un total de 18 artículos. Mediante la lectura de todos ellos, se determinó que el protozoo involucrado en el brote fue *Leishmania infantum*, transmitido a través del vector *Phlebotomus perniciosus*. Los principales municipios afectados fueron Fuenlabrada, Getafe y Leganés, todos ellos localizados en las inmediaciones del parque de Bosque Sur. Las manifestaciones clínicas de los afectados fueron tanto cutáneas como viscerales. Las obras realizadas en la carretera M-407 fueron las responsables de un cambio en las dinámicas de transmisión de *L. infantum*, lo que junto con la inauguración del parque Bosque Sur en 2007, generó las condiciones ideales para la reproducción del principal reservorio, las liebres, dando lugar al brote de la Comunidad de Madrid de 2009.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are a set of zoonotic diseases caused by various species of *Leishmania*, a group of strict parasitic protozoa with an heteroxenous cycle, alternating an invertebrate host, which acts as a vector, and a vertebrate host, usually mammal, which can act as asymptomatic reservoir. Epidemiologically, they are endemic diseases on every continent except Antarctica and affect between 700.000 and one million people each year. Their main reservoir are dogs and they are transmitted through hematophagous diptera known as phlebotomes. In humans, the infection can be presented in three forms depending on the species of *Leishmania* involved: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. The diagnosis is made using parasitological, molecular and immunological techniques. The reference technique for the current taxonomy of leishmanias is the isoenzymatic analysis (MLEE), although it is gradually being replaced by molecular methods that are more resolute. In 2009, one of the largest outbreaks of leishmaniasis in humans reported to date occurred in the Community of Madrid, characterized mainly by the presence of an alternative reservoir: the hare (*Lepus granatensis*).

The aim of the present thesis is to describe the epidemiology and genetics of this outbreak. For this, a bibliographic search was carried out in the WOS database with the keywords “*Leish\** AND outbreak AND Madrid” including the results of the categories: articles, reviews and others. After reading the titles and abstracts, a total of 18 articles were selected. By reading all of them, it was determined that the protozoan involved in the outbreak was *Leishmania infantum*, transmitted through the vector *Phlebotomus perniciosus*. The main municipalities affected were Fuenlabrada, Getafe and Leganés, all of them located in the surroundings of the Bosque Sur park. The clinical manifestations of those affected were both cutaneous and visceral. The works carried out on the M-407 road were responsible for a change in the transmission dynamics of *L. infantum*, which together with the inauguration of the Bosque Sur park in 2007, generated the ideal conditions for the reproduction of the main reservoir, the hares, giving rise to the outbreak in the Community of Madrid in 2009.

## **REFLEXIÓ SOBRE ÈTICA**

Algunes mesures de control aplicades per a l'erradicació de malalties zoonòtiques han generat molta polèmica al llarg dels anys, en específic per part dels animalistes. Aquesta polèmica ha tornat a sorgir amb l'eliminació de 29.000 conills i llebres sospitosos de ser reservoris en el brot de leishmaniosi de Madrid al 2009 (Fernández, 2017). Es tracta d'un debat ètic complex ja que, per una banda crec que és important donar valor a la vida dels animals i no causar-los patiment, però, per l'altra, és necessari fer front al que ja és considerat el major brot de leishmaniosi conegut fins a dia d'avui a la conca mediterrània. A més, l'expansió del brot no afecta únicament als humans sinó que altres mamífers tals com gossos o gats entre d'altres poden veure's afectats, cosa que també s'ha de tenir en compte a l'hora de prendre una decisió el més adient possible.

## **REFLEXIÓ SOBRE SOSTENIBILITAT**

Per als ecologistes, la sostenibilitat es basa en la simbiosi entre l'activitat humana i el medi ambient. Poder trobar l'equilibri entre la salut dels ecosistemes i l'assoliment d'uns objectius científics no sempre ha estat possible (Rapport, 2007). Una possible solució és compartir la informació obtinguda als experiments evitant al màxim la utilització de recursos innecessaris. Aquest treball de fi de grau ha estat bibliogràfic de manera que no s'ha fet ús de material més enllà de l'ordinador; sumat a això, les reunions realitzades han estat a través de videoconferència, evitant així la utilització d'un mitjà de transport. Personalment, crec que la creació de bases de dades com WOS són necessàries en l'àmbit científic per tal de mantenir a la comunitat unida i poder realitzar recerca de la forma més sostenible possible.

## **REFLEXIÓ SOBRE PERSPECTIVA DE GÈNERE**

La perspectiva de gènere busca trobar les diferències que poden existir entre homes i dones en diferents àmbits (Reckelhoff, 2023). Segons el portal de perspectiva de gènere de la Universitat de Girona (UdG), durant l'any acadèmic 2021/2022 les dones (10370) van superar en nombre als homes (8041) en un 12% en el Departament de Biologia de la UdG. Tot i això, entre el personal docent i investigador (PDI) hi predominen els homes (54,65%). De fet, segons el Ministeri de Ciència i Innovació del Govern d'Espanya, en el nostre país només el 41% del PDI són dones. Com a reflexió personal, penso que és important evitar els estereotips de gènere i integrar el paper de la dona en els projectes I+D de manera que puguin avançar en la seva carrera investigadora.

# 1. INTRODUCCIÓ

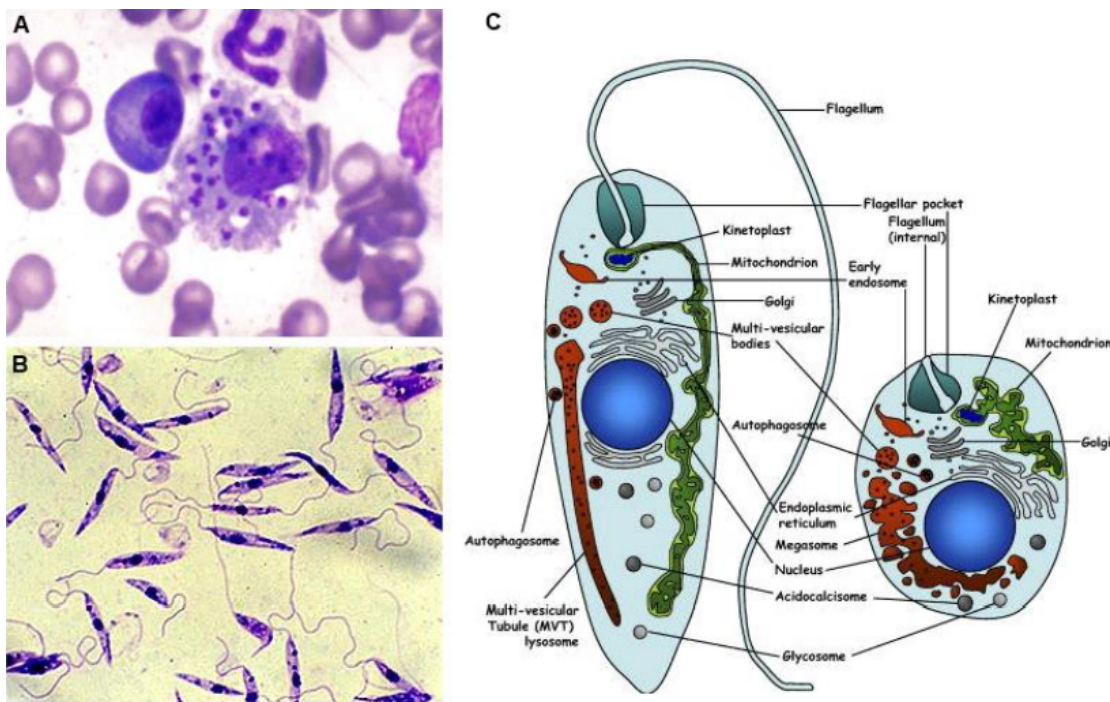
## 1.1. Contextualització a la *Leishmania* i la leishmaniosi

Les leishmaniosis corresponen a un grup de malalties zoonòtiques i parasitàries causades per diverses espècies del gènere *Leishmania*, de les que al voltant de 20 afecten als humans. Aquests agents causals de la infecció es transmeten als hostes vertebrats, generalment mamífers, a través de dípters flebotòmids (Serafim *et al.*, 2020).

## 1.2. El paràsit: *Leishmania* sp.

### 1.2.1. Aspectes generals i taxonomia

Les leishmànies pertanyen a l'ordre Kinetoplastida, família Trypanosomatidae i gènere *Leishmania* (Kaufer *et al.*, 2017). Es tracta de protozous paràsits estrictes amb la peculiaritat, com la resta de membres del mateix ordre, de presentar un orgàdul addicional anomenat kinetoplast localitzat en un únic mitocondri gegant (Souza, 2008).

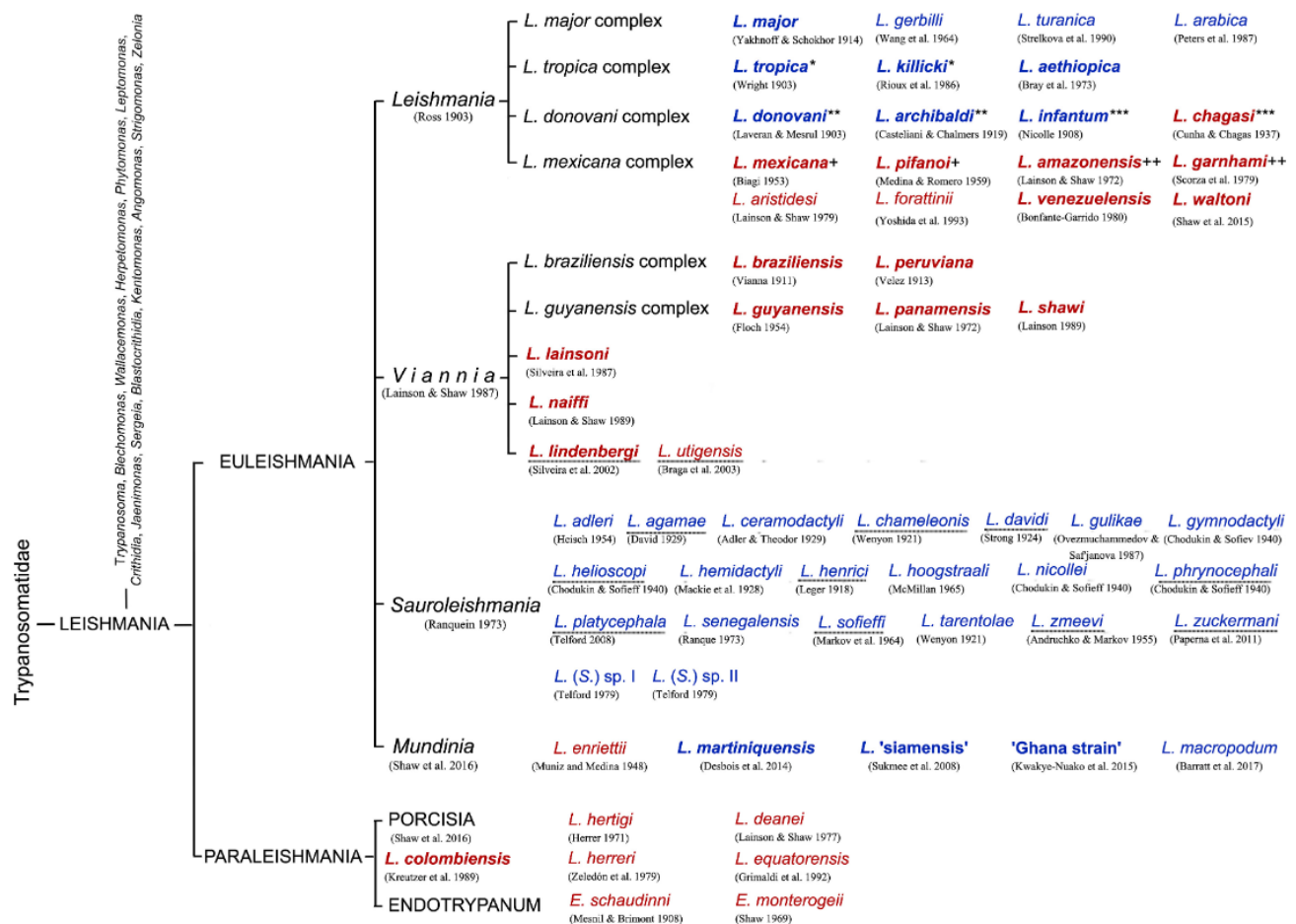


**Figura 1:** Morfologia dels amastigots (A) i promastigots (B) i representació gràfica d'aquests i els seus òrgans intracel·lulars (C) (Modificat de Besteiro *et al.*, 2007).

Pel que fa a la morfologia, les leishmànies presenten dos estadis evolutius destacables: l'amastigot i el promastigot (Figura 1) (Besteiro *et al.*, 2007). La forma amastigota és oval, de mida petita (2-6  $\mu\text{m}$  de diàmetre) i no flagel·lada mentre que la forma promastigota és fusiforme, de mida més gran (7-15  $\mu\text{m}$  de longitud) i presenta un llarg flagel·liure (Gállego Berenguer, 2007). En

tots els casos el material genètic està contingut en dos compartiments ben diferenciats: el nucli i el kinetoplast. El nucli conté el DNA nuclear, organitzat en 34-36 cromosomes, segons l'espècie (Wincker *et al.*, 1996, Britto *et al.*, 1998). El kinetoplast conté el DNA extracel·lular, anomenat DNA del kinetoplast (kDNA), i està format per dos tipus de molècules circulars, minicercles i maxicercles, organitzats en xarxa (Liu *et al.*, 2005).

El gènere *Leishmania* està compost per quatre subgèneres: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* i *Mundinia* (Figura 2). Aquests subgèneres es divideixen en complexos que agrupen les diferents espècies. Els subgèneres *Leishmania* i *Viannia*, també coneguts com a secció Euleishmania), són els clàssicament coneguts com a gènere *Leishmania* i agrupen la vintena d'espècies causants de malaltia en humans (Akhoundi *et al.*, 2017). La distribució geogràfica és un tret distintiu d'aquests dos subgèneres, *Leishmania* es sol trobar a l'anomenat vell món (Europa, Àsia i Àfrica) mentre que *Viannia* es localitza exclusivament al Nou Món (Amèrica) (Akhoundi *et al.*, 2016).



**Figura 2:** Taxonomia del gènere *Leishmania* (Akhoundi *et al.*, 2017).

### 1.2.2. El vector i els reservoris

El cicle de les leishmànies és heteroxè, és a dir, alterna un hoste invertebrat, que actua com a vector, i un hoste vertebrat. S'estima que hi ha al voltant de 100 espècies de dípters flebotòmids



(flebotoms), principalment dels gèneres *Phlebotomus* i *Lutzomyia*, susceptibles de transmetre el paràsit (Figura 3) (Maroli *et al.*, 2013). Algunes espècies d'aquests insectes hematòfags estan adaptades de forma específica a una espècie concreta de *Leishmania*, mentre que altres són capaces de transmetre diverses espècies diferents del paràsit. El rang d'activitat dels flebotoms es troba entre els 15 i els 28°C i sempre està associat a l'absència de pluja i vent. La majoria d'espècies associades als humans presenten activitat crepuscular o nocturna, quan la temperatura baixa als 19-20°C i augmenta la humitat relativa. El període d'activitat varia segons la localització geogràfica però a grans trets va des de principis de primavera a finals de tardor a la conca mediterrània i durant tot l'any a Amèrica del Sud (WHO, 2010).

Per altra banda, els hostes vertebrats són generalment mamífers que, a més, poden actuar com a reservoris asimptomàtics. S'han trobat infeccions en animals tan domèstics com salvatges com per exemple: gats, gossos, cavalls, cangurs, rates i altres rosegadors, peresosos, conills, guineus, teixons, entre d'altres (WHO, 2010). De tots ells, el gos destaca com a principal espècie diana (Serafim *et al.*, 2020).

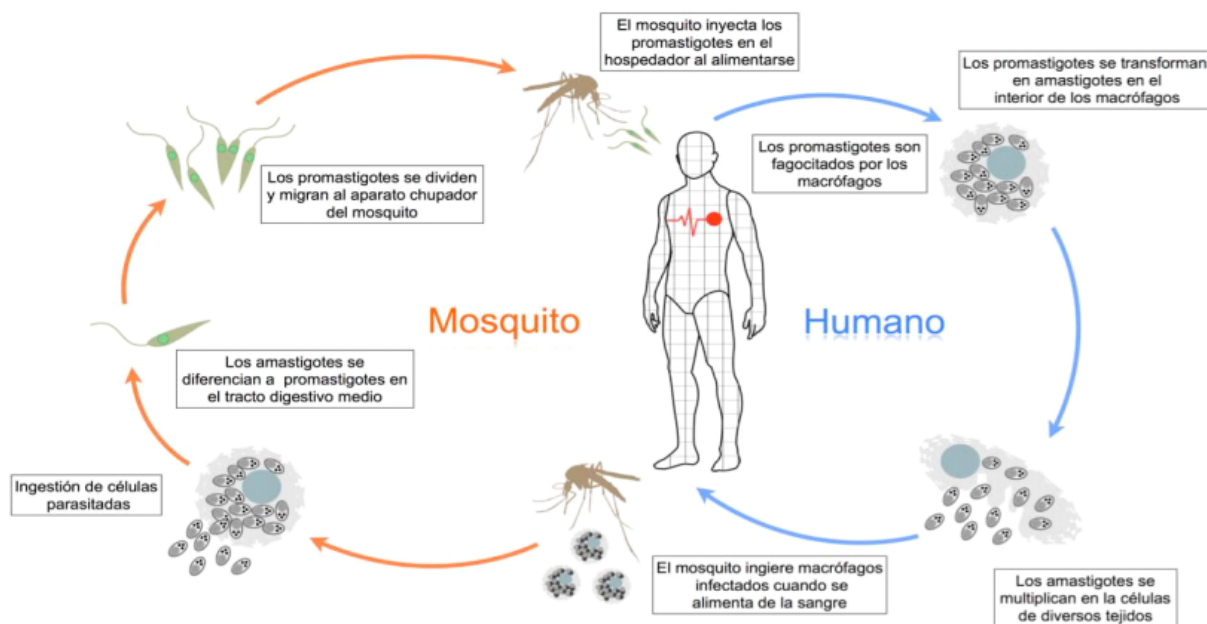


**Figura 3:** Femella adulta de *Phlebotomus papatasi* alimentant-se de la sang d'un humà (Wikimedia Commons, 2006).

### 1.2.3. Cicle biològic

El cicle biològic de *Leishmania* sp. comprèn l'alternança de les seves dues formes evolutives principals: l'amastigota intracel·lular a l'hoste vertebrat i la promastigota extracel·lular a l'hoste invertebrat (Figura 4). El cicle s'inicia quan els promastigots són inoculats a l'hoste vertebrat durant una ingesta de sang per part de l'hoste invertebrat (flebotom). Els promastigots són fagocitats pels macròfags del sistema immunitari de l'hoste vertebrat on es transformen en amastigots i es divideixen per fissió binària fins a trencar la membrana del macròfag i ser alliberats. Aquests amastigots lliures són captats per altres cèl·lules fagocítiques fins a produir-ne la lisi i així successivament (Del Rosal Rabes *et al.*, 2010).

Aquest procés d'infecció pot disseminar-se a altres zones de la pell, mucoses i teixits a través dels sistemes limfàtic i circulatori. Els òrgans i teixits del sistema limfàtic mononuclear com el fetge, la melsa i la medul·la òssia són els més afectats (Teixeira *et al.*, 2013). Els amastigots continguts dins de cèl·lules fagocítiques poden ser ingerits de nou per un flebotom al produir-se la picada. Les formes amastigotes són llavors alliberades de les cèl·lules que les contenen i passen a forma promastigota multiplicant-se per fissió binària a l'intestí de l'hoste invertebrat. Finalment els promastigots metacíclics o infectants es dirigiran a la regió bucal del flebotom tancant, d'aquesta manera, el cicle (De Almeida *et al.*, 2003).



**Figura 4:** Cicle biològic de *Leishmania* sp. (Escudero, 2015).

### 1.3. La malaltia: les leishmaniosis

Les leishmaniosis són el conjunt de manifestacions produïdes pels paràsits del gènere *Leishmania*. Actualment formen part de la llista de malalties tropicals desatenses (de l'anglès *Neglected Tropical Diseases*, NTD) (eBioMedicine, 2023).

#### 1.3.1. La leishmaniosi humana

La picada d'un flebotom no implica sempre desenvolupar la malaltia ja que es tracta d'un procés multifactorial en el que s'hi veuen involucrats tan factors del paràsit com de l'hoste. En humans, en cas de que la infecció cursi amb simptomatologia, pot presentar-se en tres grans formes en funció de l'espècie de *Leishmania* involucrada:

- ***Leishmaniosi cutània (LC):*** És la forma més comú ja que totes les espècies patògenes de *Leishmania* poden donar lloc a aquesta presentació. L'afecció cutània localitzada

comença amb un envermelliment i inflamació a la zona de la picada que evoluciona a pàpula amb possible ulceració. Les lesions es solen resoldre per si solen després d'un període de temps variable (Gontijo & de Carvalho, 2003).

- ***Leishmaniosi mucocutània (LMC)***: Sol derivar d'una LC. Es veuen afectades les mucoses nasals i orals amb possibilitat d'expansió a l'orofaringe formant lesions ulcerades. S'associa principalment a *L. braziliensis* i *L. panamensis* (Abadías-Granado *et al.*, 2021).
- ***Leishmaniosi visceral (LV)***: Associada principalment al complex *L. donovani*. La infecció evoluciona a un quadre de febre intermitent que pot derivar, sense el tractament adequat, cap a la mort del pacient per anèmia severa i altres infeccions derivades de la fragilitat del sistema immunitari. Les zones més afectades són l'est d'Àfrica, l'Índia i el Brasil (Kumar & Nylén, 2012).

També cal tenir en compte que, en les últimes dècades, i degut als processos de globalització, han aparegut casos de leishmaniosi importades, és a dir, infeccions produïdes per espècies de *Leishmania* no autòctones ja que s'han contret en un país diferent al que es diagnostica.

Finalment, nombrosos estudis han demostrat la importància de la resposta generada pels limfòcits B i el seu efecte antiparasitari (Conde *et al.*, 2022) de manera que, els pacients immunodeprimits (sigui per infeccions com el VIH o per medicació post-transplantacional) son avui en dia la població més afectada per la leishmaniosi (Burza *et al.*, 2018).

### **1.3.2. Diagnòstic, identificació d'espècies i tractament**

Quan hi ha sospita de LC s'agafa mostra de la lesió mentre que pel diagnòstic de la LV cal mostra d'aspirat de medul·la òssia, gangli limfàtic o melsa, biòpsia de fetge o mostra de sang (Akhoundi *et al.*, 2017). A continuació, el diagnòstic es pot realitzar mitjançant tècniques parasitològiques, moleculars o immunològiques. El diagnòstic parasitològic inclou l'observació del paràsit en mostra directa o bé el seu cultiu i posterior observació (Thakur *et al.*, 2020). Els mètodes moleculars impliquen la detecció del material genètic del protozou. La més utilitzada és la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que permet l'amplificació de fragments concrets del DNA parasitari. Finalment, les tècniques immunològiques es basen en la detecció del patogen gràcies a l'especificitat antígen-anticòs. Dins d'aquestes últimes es poden destacar l'ELISA, la immunofluorescència o la immunocromatografia (Srivastava *et al.*, 2011).

Per altra banda, distingir les espècies de *Leishmania* té interès tan a nivell clínic com per estudis filogenètics i epidemiològics. Les espècies, però, no presenten cap característica morfològica que permeti la seva diferenciació. Actualment, existeixen una gran varietat de tècniques basades en

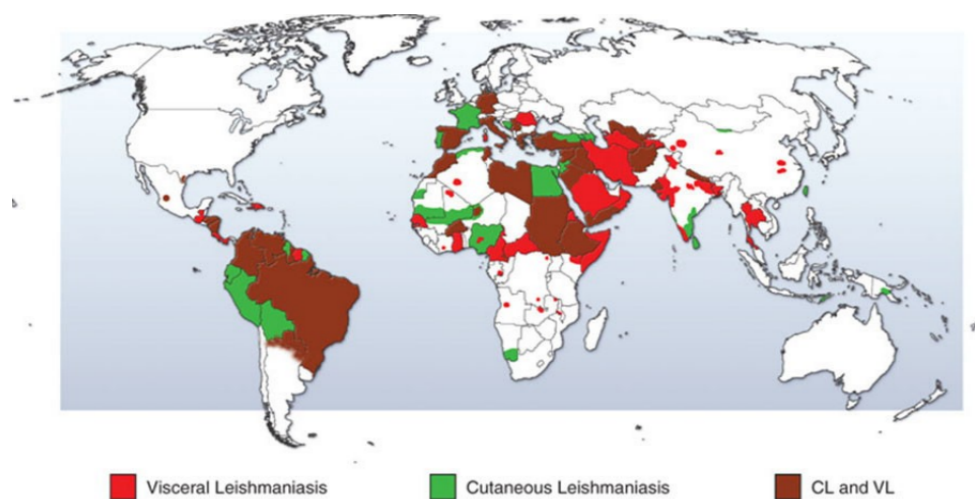
diferències bioquímiques, genètiques o proteòmiques i cada laboratori utilitza la que li convé o la que té a disposició (Thakur *et al.*, 2020).

Dins de les estratègies bioquímiques en destaca l'anàlisi isoenzimàtic o electroforesi d'enzims multilocus (de l'anglès *MultiLocus Enzyme Electrophoresis*, MLEE), en la que es basa la taxonomia actual i constitueix la tècnica de referència per la caracterització de soques de *Leishmania* (Chicharro *et al.*, 2013). El mètode parteix de la premissa que, generalment, les diferents isoformes dels enzims estan codificades per un mateix gen. La presència de mutacions es tradueixen en canvis a nivell de la proteïna que fan alterar la seva velocitat de migració electroforètica. Es realitza una electroforesi en gels de midó, poliacrilamida o acetat de cel·lulosa dels extractes proteics de les soques de *Leishmania* i es fa un revelat posterior dels enzims seleccionats. Així, s'acaba obtenint un perfil enzimàtic de cada soca que permetrà englobar-la dins d'un zimodema, és a dir, d'un conjunt de soques que comparteixen el mateix perfil isoenzimàtic (Rioux *et al.*, 1990). Actualment, l'anàlisi isoenzimàtic o MLEE està essent substituït per mètodes moleculars, més moderns i resolutius (Chicharro *et al.*, 2013).

El tractament de la malaltia depèn de la simptomatologia. Els pacients amb LV requereixen de tractament sistèmic mentre que les persones amb LC poden necessitar o no tractament dependent del nombre i gravetat de les lesions (Basmaciyan & Casanova, 2019).

### 1.3.3. Àrea de distribució de la leishmaniosis a escala global

Els paràsits *Leishmania* tenen una distribució mundial amb presència a tots els continents excepte a l'Antàrtida (Bañuls *et al.*, 2007) (Figura 5). La malaltia és endèmica en un centenar de països i hi ha entre 700.000 i un milió de casos nous reportats anualment a tot el món (WHO, 2023).



**Figura 5:** Distribució geogràfica mundial de les leishmaniosis i les formes més comunes a cada país. (Sanjuan, 2018).

### **1.3.4. La leishmaniosi a Espanya**

A Espanya, la leishmaniosi es considera endèmica donant-se casos de LC i LV. L'agent causal de la leishmaniosi autòctona a Espanya és *L. infantum* (destacant els zimodemes MON-1 i MON-24) actuant com a vectors principals els flebotoms *P. perniciosus* i *P. ariasi* i com a reservori el gos (Chicharro *et al.*, 2013; Le Rutte *et al.*, 2021). L'any 2009 es va reportar, però, un cicle alternatiu a Fuenlabrada (Madrid), en el que conills i llebres van actuar com a reservori principal i que es va convertir en un dels major brots de leishmaniosis humana a Europa (Suárez Rodríguez *et al.*, 2012).

## **2. OBJECTIVES**

In this context, the aim of the present Bachelor's Thesis is to analyze the epidemiological and genetic features of the human leishmaniasis outbreak confirmed in the southwestern Madrid region (Spain) between 2009 and 2012 in order to understand the causes of the largest European outbreak of this type and avoid possible future similar events.

## **3. MATERIALS I MÈTODES**

Durant el mes de novembre de 2022, es va realitzar una cerca bibliogràfica a les bases de dades *Web of Science* (WOS), *Scopus* i *Pubmed* mitjançant l'ús de paraules clau i eines booleans.

Les publicacions disponibles dins d'aquestes plataformes es van obtenir mitjançant una combinació específica de paraules clau: "Leish\* AND outbreak AND Madrid". Es va filtrar per tipologia de document incloent els articles i els articles de revisió i s'hi van incloure totes les entrades disponibles fins a la data de la cerca. A continuació es va fer una lectura del títol i el resum de cadascun dels resultats de la cerca i es van seleccionar els articles que contenien informació rellevant per la realització del treball.

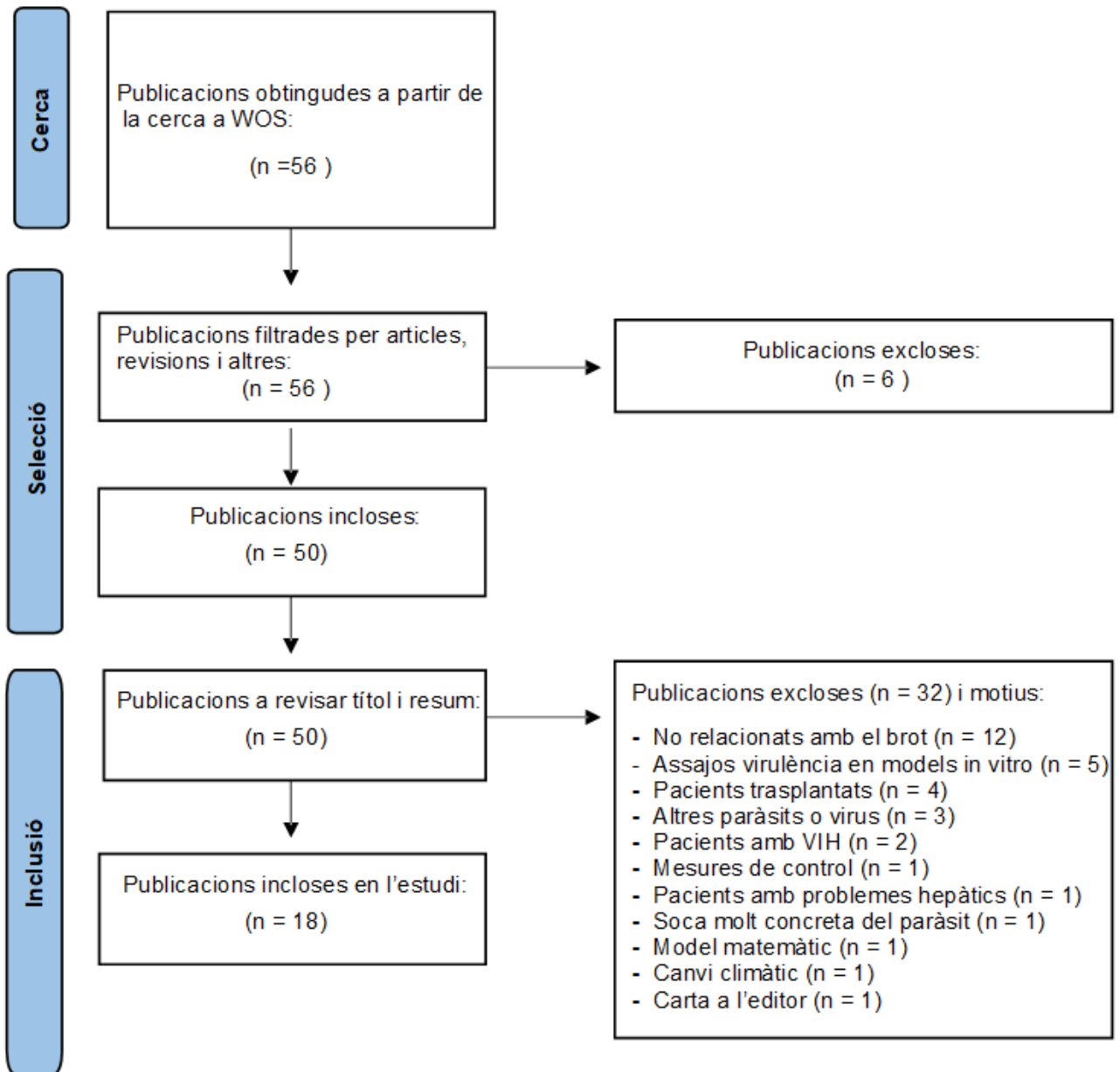
Per últim, es van llegir de forma exhaustiva totes les publicacions seleccionades, se'n va seleccionar la informació clau i es van sintetitzar els continguts rellevants.

## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

### **4.1. Resultats de la cerca bibliogràfica i anàlisi dels articles seleccionats**

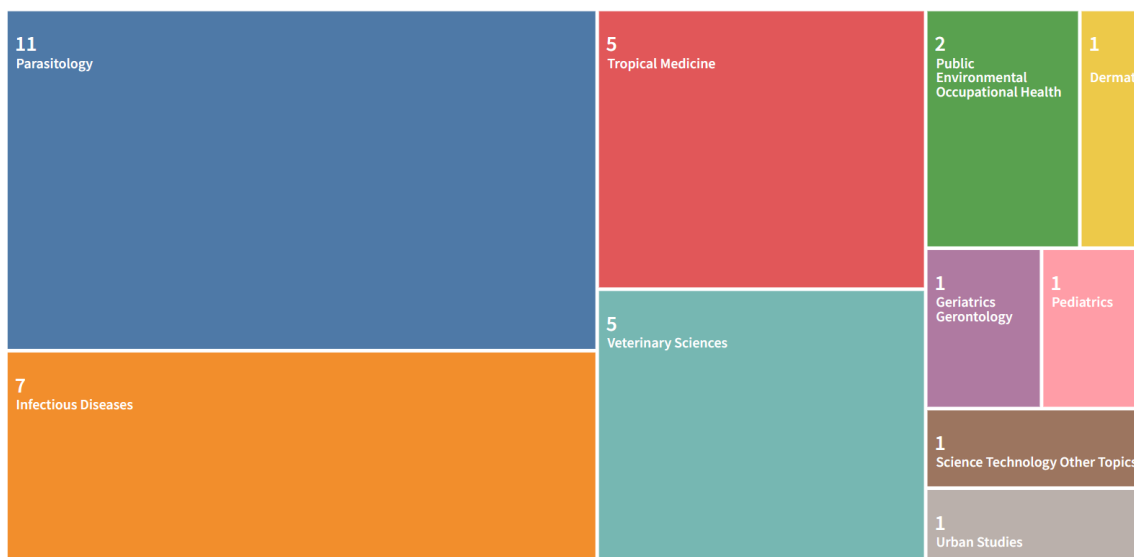
A partir de la cerca bibliogràfica a WOS utilitzant les paraules clau "Leish\* AND outbreak AND Madrid", es van obtenir 56 resultats (Figura 6). Les cerques a *Scopus* i *Pubmed* van resultar en els

mateixos articles prèviament obtinguts a WOS. Per tant, l'anàlisi de resultats es va centrar en els articles obtinguts a partir de la cerca a WOS. A continuació, es va aplicar el filtre per "articles, revisions i altres" i les entrades es van reduir a 50. Després de llegir els títols i els resums, es van excloure 32 articles ja que la majoria d'aquests no estaven relacionats amb el brot de Madrid del 2009. Els motius d'exclusió queden recollits a la Figura 6. La selecció final va ser d'un total de 18 articles.



**Figura 6:** Diagrama revisió bibliogràfica PRISMA dels articles cercats mitjançant *Web of Science*.

Els 18 articles seleccionats es distribueixen en 10 categories segons WOS (Figura 7).



**Figura 7:** Categories segons WOS dels 18 articles seleccionats mitjançant les paraules clau.

A la Figura 7 es pot observar que la gran majoria dels articles seleccionats es troben a les categories de parasitologia, malalties infeccioses, medicina tropical i ciències veterinàries. També s'ha de tenir en compte que els articles poden estar inclosos en més d'una categoria a la vegada. A la Taula 1 es poden observar els articles seleccionats dins de totes les categories en les que se'ls inclou mitjançant un codi de colors.

**Taula 1:** Categorització individual de cada un dels articles seleccionats segons WOS.

Articles	Referència	Categoria				
Opportunistic feeding behaviour and <i>Leishmania infantum</i> detection in <i>Phlebotomus perniciosus</i> females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012-2018)	González <i>et al.</i> (2021)					
<i>Leishmania</i> sp. detection and blood-feeding behaviour of <i>Sergentomyia minuta</i> collected in the human leishmaniasis focus of southwestern Madrid, Spain (2012-2017)	González <i>et al.</i> (2020)					
Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by <i>L. infantum</i> in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned?	Horrillo <i>et al.</i> (2019)					
Efficacies of prevention and control measures applied during an outbreak in Southwest Madrid, Spain	Sevá <i>et al.</i> (2017)					

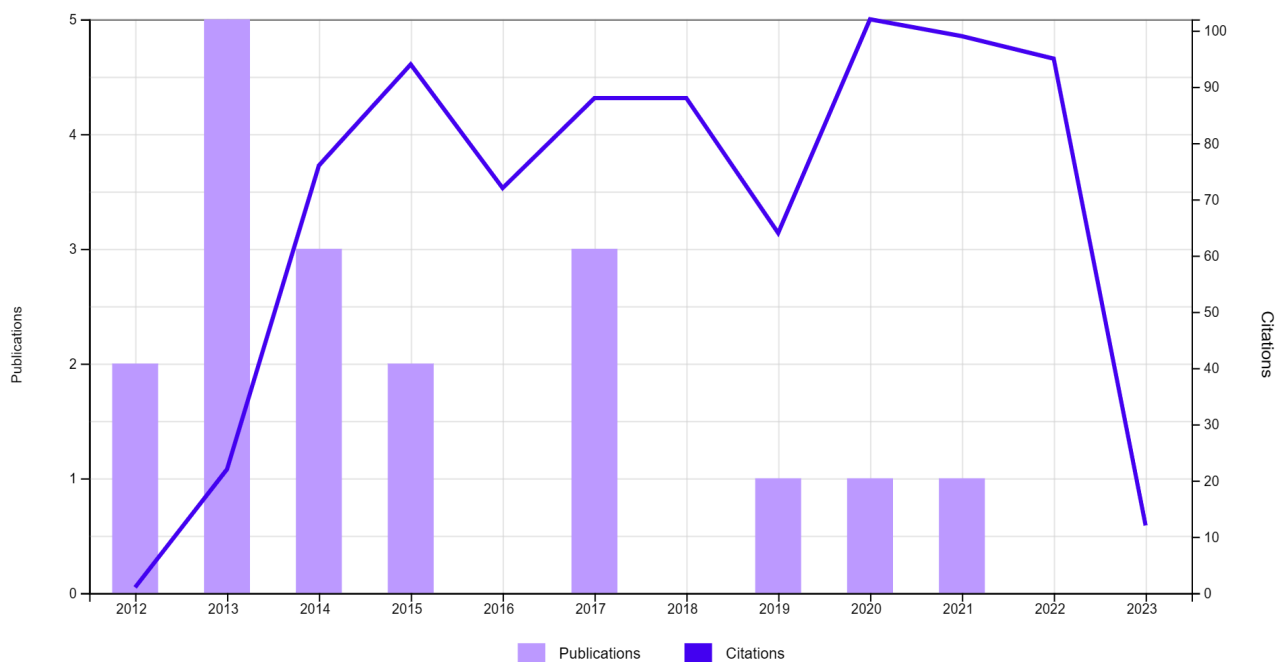
Detection of high <i>Leishmania infantum</i> loads in <i>Phlebotomus perniciosus</i> captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR	González <i>et al.</i> (2017a)	Red	Yellow		
Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, <i>Leishmania infantum</i> infection rates and blood meal preferences	González <i>et al.</i> (2017b)	Red	Yellow		
Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene	González <i>et al.</i> (2015)	Red	Yellow		
Spatial distribution and cluster analysis of a leishmaniasis outbreak in the south-western Madrid region, Spain, September 2009 to April 2013	Gomez-Barroso <i>et al.</i> (2015)		Orange		
Could wild rabbits ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) be reservoirs for <i>Leishmania infantum</i> in the focus of Madrid, Spain?	Jiménez <i>et al.</i> (2014)	Red		Green	
High levels of anti- <i>Phlebotomus perniciosus</i> saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain	Martin-Martin <i>et al.</i> (2014)	Red		Green	
Detection of anti- <i>Leishmania infantum</i> antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test	Moreno <i>et al.</i> (2014)	Red		Green	
What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid?	Carrillo, Moreno i Cruz (2013)	Red			
Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012	Arce <i>et al.</i> (2013)		Orange		
Molecular typing of <i>Leishmania infantum</i> isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012	Chicharro <i>et al.</i> (2013)		Orange		



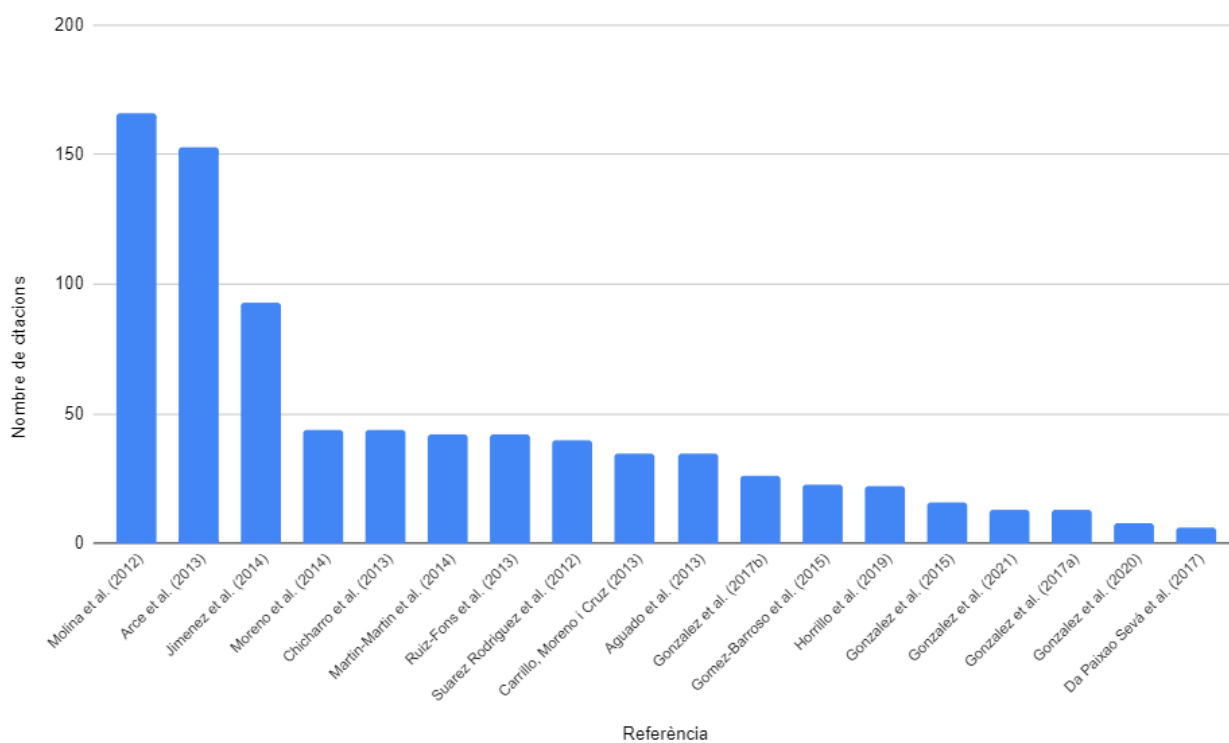
<i>Leishmania infantum</i> in free-ranging hares, Spain, 2004-2010	Ruiz-Fons <i>et al.</i> (2013)								
Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Fuenlabrada, Madrid.	Aguado <i>et al.</i> (2013)								
The hare ( <i>Lepus granatensis</i> ) as potential sylvatic reservoir of <i>Leishmania infantum</i> in Spain	Molina <i>et al.</i> (2012)								
Review of the Current Situation and the Risk Factors of <i>Leishmania infantum</i> in Spain	Suárez Rodríguez <i>et al.</i> (2012)								

	Parasitology		Dermatology
	Infectious diseases		Gerontology
	Tropical medicine		Pediatrics
	Veterinary sciences		Technological sciences and other topics
	Environmental labor public health		Urban studies

A més, en l'analitzar els anys de publicació i de les citacions dels treballs seleccionats (Figura 8), s'observa que l'any amb major nombre d'articles publicats va ser el 2013, coincidint amb el final del brot i la creixuda de l'interès per entendre el que havia succeït. El nombre de publicacions va anar decreixent progressivament i l'últim article publicat que hi fa referència data del 2021. El nombre de citacions dels articles va fluctuant amb un pic màxim de cinc cites l'any 2020. Tots aquests articles en conjunt han estat citats un total de 747 vegades, sense tenir en compte les autocitacions, i l'article més citat ha estat Molina *et al.* (2012) seguit de Arce *et al.* (2013) (Figura 9). Es tracta dels dos primers articles publicats sobre el brot i ens els que s'indica el paper rellevant que hi tenen les llebres com a reservori principal.



**Figura 8:** Nombre d'articles publicats cada any (barres) i nombre de cites per any (línia contínua) del conjunt d'articles seleccionats.

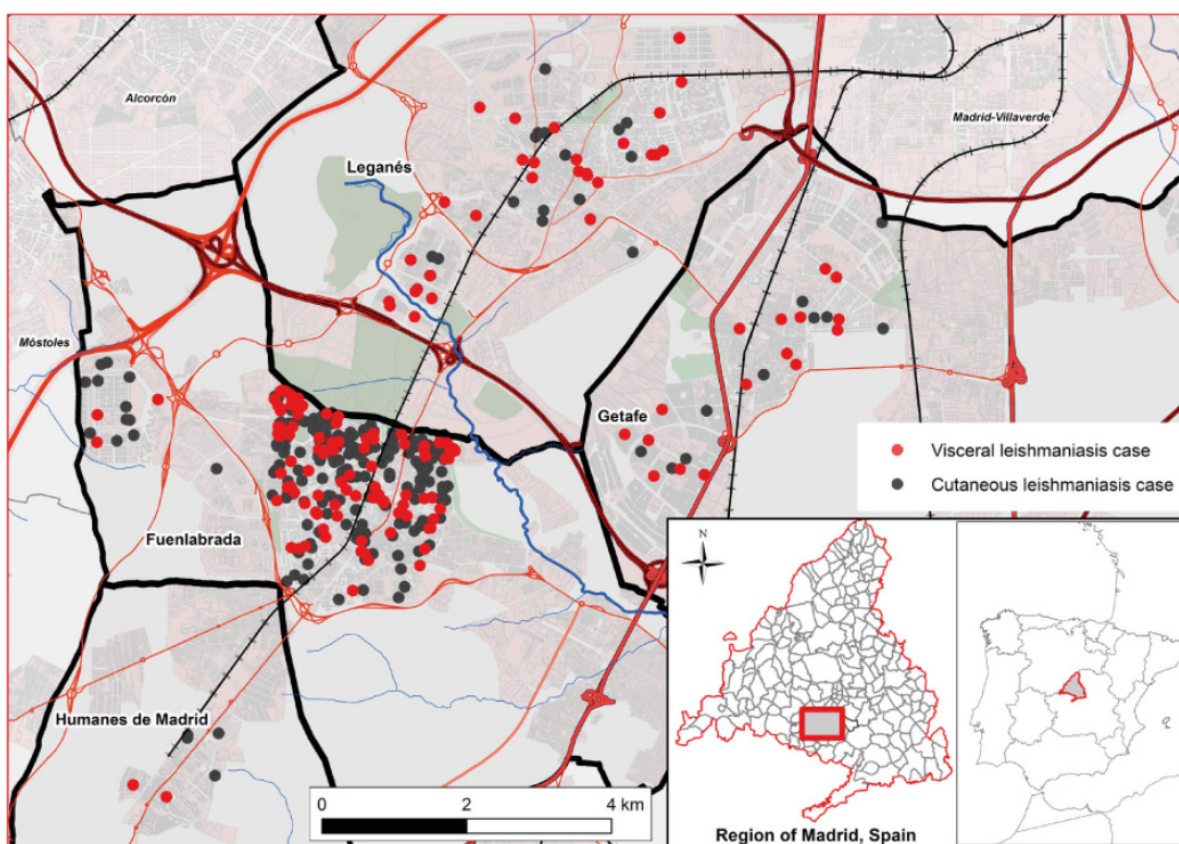


**Figura 9:** Nombre de citacions de cada article inclòs en el present estudi fins a data 06/06/2023.

El contingut dels 18 articles seleccionats s'han dividit en diferents seccions que es presenten a continuació en els propers apartats.

## 4.2. Descripció del brot i epidemiologia

El mes de juliol de l'any 2009 es va reportar un dels majors brots de leishmaniosi humana a Europa, concretament a la zona sud-oest de la comunitat autònoma de Madrid (Espanya). Fins al mes de juny del 2020, es van registrar 470 casos de LC i 303 casos de LV a la Comunitat de Madrid, amb un pic de 197 casos durant l'any 2011 (Arce *et al.*, 2013; González *et al.*, 2021). Aproximadament un 15% dels casos presentaven condicions d'immunosupressió (Arce *et al.*, 2013); aquests pacients, requereixen especial atenció, ja que les malalties immunitàries com el VIH, els tractaments immunosupressors, els problemes hepàtics o la malnutrició poden debilitar el sistema immunitari i, per tant, la capacitat de resposta de l'individu a la infecció per *Leishmania* sp. presentant més problemes per combatre la malaltia (Horrillo *et al.*, 2019).



**Figura 10:** Distribució espacial dels casos per lloc de residència i presentació clínica del brot de leishmaniosi a la Comunitat de Madrid, juliol 2009-desembre 2012 (n=446) (Arce *et al.*, 2013).

Durant el període del brot (2009-2012) la majoria dels casos es van localitzar als municipis de Fuenlabrada, Getafe i Leganés, tots ells situats a la perifèria del parc forestal periurbà Bosque Sur (Figura 10) (Arce *et al.*, 2013; Gómez-Barroso *et al.*, 2015). Aquest espai natural es va inaugurar l'any 2007 i alberga una important àrea protegida rica en flora i fauna (Arce *et al.*, 2013). A més d'aquesta zona de nova plantació, durant el període 2009-2010 es van realitzar obres públiques en una de les carreteres principals (M-407) cap a Fuenlabrada. Tots aquests canvis recents a nivell

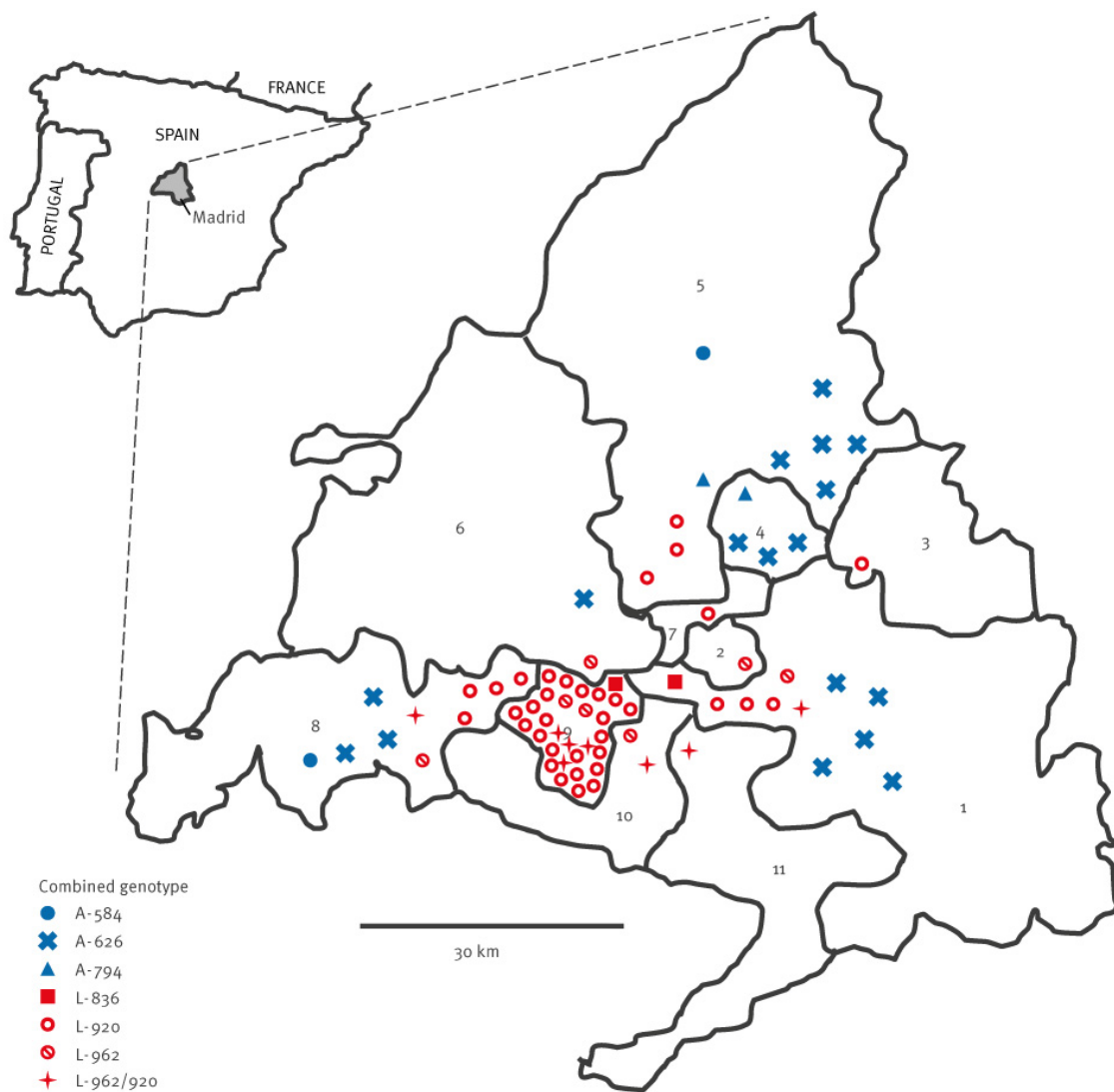
periurbà probablement van alterar l'ecologia de la zona i la dinàmica de transmissió de la leishmaniosi, la que sempre es veu relacionada amb activitats humanes a prop o dins de zones boscoses (Gómez-Barroso *et al.*, 2015). El principal focus de transmissió es va localitzar al municipi de Fuenlabrada que ha passat de ser un nucli rural envoltat de terrenys agrícoles amb poc més de 7.000 habitants durant els anys 70, a ser un nucli urbà amb 190.000 habitants censats l'any 2011. Les zones agrícoles es van convertir en zones verdes i parcs públics pròxims a les zones residencials (Suárez Rodríguez *et al.*, 2012).

Aguado *et al.* (2013) va reportar 149 casos de LC diagnosticats al Servei de Dermatologia de l'Hospital de Fuenlabrada durant 17 mesos (octubre 2010-febrer 2012) amb una incidència similar en homes i dones i una freqüència més elevada a la franja d'edat d'entre 46 i 60 anys. A l'estudi d'Arce *et al.* (2013) es van incloure 446 casos reportats entre 2009 i 2012 a la Comunitat de Madrid, el que suposa una taxa d'incidència mitjana de 22,2 per cada 100.000 habitants. L'edat mitjana va ser de 44 anys (en rang 2 mesos a 95 anys) i el 61% eren homes.

#### **4.3. Genètica dels aïllats de *Leishmania***

Dels 446 casos reportats entre 2009 i 2012 se'n van poder confirmar al laboratori un total de 421 (94,4%). *Leishmania infantum* va ser identificat com l'agent causal en tots els casos confirmats (Arce *et al.*, 2013).

En un estudi realitzat al Centre Col·laborador de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) en leishmaniosi (Centre Nacional de Microbiologia, Instituto de Salud Carlos III, Madrid), es van poder diagnosticar 475 casos de la infecció a Madrid durant el període de gener de 2008 a juliol de 2012 (Chicharro *et al.*, 2013). En aquest centre de referència de l'OMS hi arriben mostres de tota la Comunitat de Madrid. El diagnòstic es realitza mitjançant mètodes moleculars i serològics i també mitjançant l'aïllament dels paràsits en el medi de cultiu Novy-MacNeal-Nicolle (NNN). En aquest cas, el mètode de diagnòstic emprat va ser la PCR. Dels 475 casos, 251 van ser LC, 206 LV i 18 altres formes de leishmaniosi. Es va poder obtenir el cultiu amb èxit d'un total de 73 aïllats que van ser identificats com a *L. infantum* mitjançant seqüenciació del gen hsp70 (heat shock protein) i analitzats mitjançant la seqüenciació dels fragments ITS (ribosomal internal transcribed spacers) 1 i ITS2 i del gen haspb (k26). A través de la combinació dels resultats obtinguts per les dues dianes, es van obtenir un total de set genotips diferents (Figura 11).



The numbers 1–11 represent the 11 Health Areas in Madrid. The combined genotypes of the isolates are shown.

**Figura 11:** Distribució geogràfica dels set genotips de *Leishmania infantum* aïllats a la Comunitat de Madrid desde gener del 2008 fins a juliol del 2012 (n = 73) (Chicharro *et al.*, 2013).

#### 4.4. Vectors i reservoris involucrats al brot

A la península Ibèrica existeixen un total d'onze espècies diferents de flebotoms però només s'han sspconfirmat *Phlebotomus perniciosus* i *P. ariasi* com a vectors de *Leishmania* spp. L'espècie més abundant a la regió on es va donar el brot és *P. perniciosus*, seguit de *Sergentomyia minuta* (González *et al.*, 2020). *Sergentomyia minuta* és reconegut com a vector transmissor de *Leishmania* en rèptils. No obstant, González *et al.* (2020), van demostrar que la dieta de *S. minuta* no es limita a la sang dels rèptils sinó que també s'alimenta de mamífers, inclosos els humans. L'estudi es va basar en l'amplificació i posterior seqüenciació d'un fragment de 359 pb del gen citocrom b a partir del DNA extret del tòrax i l'abdomen dels flebotoms. L'equip de González prèviament ja havia utilitzat aquesta diana combinada amb la metodologia de PCR-RFLP

(González *et al.*, 2015). De les 377 mostres de *S. minuta* recollides, es va detectar la presència de *Leishmania* en el 18% a través de l'amplificació del fragment ITS1. Per tant, tot i que no es confirma que *S. minuta* estigui involucrada en el cicle de transmissió de *L. infantum*, el seu comportament alimentari oportunista encaixa amb la seva possible contribució a la propagació del brot de la Comunitat de Madrid (González *et al.*, 2020).

Pel que fa a *P. perniciosus*, González *et al.* (2017a) confirma la contribució principal d'aquest en el brot de Madrid a través de la detecció de càrregues parasitàries elevades de *Leishmania* en els flebotoms d'aquesta espècie capturats a la zona del brot mitjançant PCR a temps real amb diana als minicercles del kDNA del paràsit. El mateix any, l'estudi de González *et al.* (2017b) també corrobora aquests resultats utilitzant com a dianes un fragment de 120 pb del kDNA i el gen cisteïna proteïnasa b (cpb). L'estudi analitza 45.127 espècimens de flebotoms recol·lectats durant el període 2012-2014 de diferents estacions pròximes al parc Bosque Sur. Amb aquesta captura intensiva, es van trobar un total de quatre espècies de flebotoms: *P. perniciosus* i *S. minuta* (els més abundants) i *P. sergenti* i *P. papatasi*, els quals apareixien de forma esporàdica. No es va trobar presència de *P. ariasi*. Els espècimens de *P. perniciosus* presentaven taxes d'infecció elevades per *L. infantum* (González *et al.*, 2017b). Pel que fa a les preferències alimentàries de *P. perniciosus*, van detectar principalment DNA de conill i llebre tot i que també se'n va trobar d'humà, gat i gos a través de la seqüenciació del fragment de 359 pb del citocrom b (González *et al.*, 2017b).

Un estudi entomològic posterior dels mateixos autors (González *et al.*, 2021) va detectar mitjançant la seqüenciació del mateix fragment de citocrom b d'exemplars de *P. perniciosus* capturats a la zona del brot, DNA de llebre i conill en el 46% i 22%, respectivament. També es va detectar DNA d'altres mamífers però en un percentatge molt inferior, demostrant així l'alimentació oportunista de *P. perniciosus*. L'estudi de Martín-Martín *et al.* (2014) també confirma el mateix fet detectant elevats nivells d'anticossos anti-*P. perniciosus* a la saliva de diversos hostes vertebrats, destacant el paper de les llebres. A més, mitjançant PCR i seqüenciació d'un fragment de kDNA, el gen cpb i la regió ITS, es va detectar infecció per *L. infantum* en un 8,97% dels *P. perniciosus* capturats (González *et al.*, 2021).

Tot i ser el gos el principal reservori de *Leishmania* sp., durant l'emergència del brot no es va observar un augment en els casos de leishmaniosi canina a la zona (Carrillo *et al.*, 2013); a més, González *et al.* (2021) demostra que cap flebotom dels recol·lectats al seu estudi presentava sang de gos al seu interior. Tot el recapitulat, sumat a la gran població de llebres i conills a l'àrea de Bosque Sur fa pensar que podrien ser els reservoris responsables del brot de leishmaniosi de Madrid del 2009 (González *et al.*, 2015).

#### 4.5. Confirmació del paper de les llebres com a principal reservori

L'estudi de Molina *et al.* (2012) confirma el paper de les llebres en el brot de leishmaniosi de Madrid. A partir de xenodiagnòstic (Figura 12), van demostrar que les llebres ibèriques (*Lepus granatensis*) procedents de la zona del brot estan infectades amb *L. infantum* a través de l'anàlisi molecular (PCR i seqüenciació de les regions ITS1, ITS2 i el gen hsp70) dels flebotoms *P. perniciosus* utilitzats en l'experiment. En un estudi xenodiagnòstic similar, Jiménez *et al.* (2014) va demostrar la infecció per *L. infantum* en conills salvatges (*Oryctolagus cuniculus*). Aquest fet fa pensar que els conills també tenen un paper destacat en el brot de leishmaniosi de la Comunitat de Madrid.



**Figura 12:** Conill positiu en leishmaniosi avaluat a través d'un test ràpid rk39 i posterior xenodiagnòstic a través de l'exposició d'aquest a *P. perniciosus* (Jiménez *et al.*, 2014).

Paral·lelament, Moreno *et al.* (2014) va fer servir la tècnica d'immunofluorescència indirecta (IFI) per avaluar l'exposició a *Leishmania* de sèrums d'animals de la zona del brot durant el període de juliol de 2009 a desembre de 2012. Van detectar anticossos anti-*Leishmania* en el 46% dels conills analitzats i en el 74% de les llebres estudiades, el que suggereix que les llebres asimptomàtiques són el principal reservori del brot (Moreno *et al.*, 2014).

Ruiz-Fons *et al.* (2013) també van demostrar la presència de *L. infantum* en les dues espècies de llebres predominants a Espanya: les llebres ibèriques (*L. granatensis*) i les llebres europees (*L. europaeus*) a través de PCRs amb diana al kDNA. La posterior anàlisi RFLP va permetre observar la presència de soques específiques de *L. infantum* en les llebres, diferents de les presents en altres carnívors de la Península Ibèrica (Ruiz-Fons *et al.*, 2013). Totes aquestes dades, sumat a la falta de depredadors a la zona confirmen el paper de les llebres com a principal reservori en el brot de leishmaniosi de la Comunitat de Madrid del 2009 (González *et al.*, 2021).

#### 4.6. Mesures de prevenció i control aplicades

Actualment, tot i que gràcies a les mesures de prevenció adoptades el nombre de casos ha disminuït notablement, el brot roman actiu (Horrillo *et al.*, 2019). A partir de l'augment dels casos



del 2009, la *Xarxa de Vigilància Epidemiològica* va augmentar la recerca i la coordinació entre els serveis d'atenció sanitària. Es va implementar un qüestionari telefònic en el que es recollia informació sobre casos positius: lloc de residència, entorn laboral, activitats d'oci, presència de gossos, historial de viatges per tal de resseguir l'evolució. Justament a partir d'aquest qüestionari es va determinar que cap dels pacients havia realitzat viatges de risc durant l'època de contagi (Arce *et al.*, 2013).

S'han adoptat diferents mesures pel control de la leishmaniosi en el brot de Madrid (Sevá *et al.*, 2017):

- Neteja ambiental: entre ells els caus dels conills ja que representen un bon entorn pel creixement de les larves de flebotoms dins del parc Bosque Sur.
- Control dels vectors: mitjançant l'ús d'insecticides.
- Control i vigilància dels hostes: llebres (principal reservori del brot) i conills.
- Protecció dels hostes enfront dels insectes: vacunació i ús de collars impregnats amb insecticida en gossos i gats i ús de repel·lents i insecticides en el cas dels humans.
- Educació pública sobre la leishmaniosi i els seus possibles efectes.

Sevá *et al.* (2017) van dissenyar i aplicar un model matemàtic que permet representar les dinàmiques de la leishmaniosi i així detectar quines mesures de control són més eficients per fer front al brot. Es va poder observar que les mesures que permetien reduir més el nombre de casos de leishmaniosi humana són les relacionades amb el bloqueig del contacte entre el vector i els hostes salvatges i també el control del vector en la zona urbana i de parc. El control de la malaltia en gossos és eficient quan s'utilitzen collars impregnats amb insecticides i es porta a terme vacunació, però aquestes mesures no són eficients en altres hostes.

## 5. CONCLUSIONS

The conclusions of this Bachelor's Thesis are:

- Although the cases have decreased considerably, the outbreak of leishmaniosis in the Community of Madrid, which began in 2009, is still active today. The main localities affected in the outbreak are Fuenlabrada, Leganés and Getafe, located on the periphery of the Bosque Sur natural park.



- Regarding clinical presentations, both CL (in most cases) and VL cases were observed, mainly in men between 44 and 60 years of age.
- The M-407 road works caused a change in the transmission dynamics of *Leishmania* sp. and together with the inauguration of the Bosque Sur natural park in 2007, ideal conditions were generated for the reproduction of the most susceptible reservoirs, the hares (*Lepus granatensis*).
- Although MLEE continue is still a useful tool to determine the enzymatic profile of *Leishmania* sp. strains, molecular techniques such as PCR are increasingly used. Thanks to this and to the sequencing of the hsp70 and haspb genes and the ITS1 and ITS2 fragments, it was possible to determine that the causative agent in all confirmed cases was *Leishmania infantum*. Seven different genotypes of *L. infantum* were observed in the outbreak in the community of Madrid.
- By using qPCR targeting the parasite kDNA, the vector involved in the transmission cycle of *L. infantum* in the 2009 outbreak was determined to be *Phlebotomus perniciosus*. The fact that canine leishmaniasis cases did not increase in the outbreak is explained by the opportunistic feeding behavior of this vector.
- Environmental and domestic cleaning (mainly in internal areas of Bosque Sur), vaccination and insecticides, repellents and anti-leishmanial collars in dogs and cats are essential control measures for the eradication of the outbreak.

## 6. AGRAÏMENTS

Primerament, m'agradaria agrair a la Dra. Alba Abras, ja que m'ha aconsellat en tot moment i m'ha ajudat a millorar de forma considerable la qualitat del meu treball, a organitzar-me de forma eficient i a autogestionar-me millor, donant-me llibertats però també deures. Aquest treball m'ha fet qüestionar molts punts de vista i m'ha ajudat a aprofundir en una malaltia amb tant de pes com és la leishmaniosi.

Agrair també a la meva família i als meus amics per donar-me tots els ànims que he necessitat per poder tirar endavant en un any tan de reptes personals com acadèmics, ja que sense ells no hauria estat possible.

## 7. BIBLIOGRAFIA:

Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas dermo-sifiliograficas*, S0001-7310(21)00108-3. Advance online publication.

<https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>

Aguado, M., Espinosa, P., Romero-Maté, A., Tardío, J. C., Córdoba, S., & Borbujo, J. (2013). Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Fuenlabrada, Madrid. *Actas dermo-sifiliograficas*, 104(4), 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2013.03.005>

Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*, 57, 1–29.

<https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>

Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A. M., Pérez, A. M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., & Vilas, F. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(30), 20546. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20546>

Basmacıyan, L., & Casanova, M. (2019). Cell death in *Leishmania*. La mort cellulaire chez *Leishmania*. *Parasite (Paris, France)*, 26, 71. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019071>

Bañuls, A. L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology*, 64, 1–109. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)

Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International journal for parasitology*, 37(10), 1063–1075. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.008>

Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pagès, M., Dedet, J. P., & Wincker, P. (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*, 222(1), 107–117. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00472-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00472-7)

Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 392(10151), Ceccarelli951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

Carrillo, E., Moreno, J., & Cruz, I. (2013). What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid?. *Trends in parasitology*, 29(12), 579–580. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.007>

Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I. P., García, E., Nieto, J., Moreno, J., & Cruz, I. (2013). Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(30), 20545. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20545>

Conde, L., Maciel, G., de Assis, G. M., Freire-de-Lima, L., Nico, D., Vale, A., Freire-de-Lima, C. G., & Morrot, A. (2022). Humoral response in Leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 1063291. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1063291>

de Almeida, M. C., Vilhena, V., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2003). Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 861–870. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000700001>

Del Rosal Rabes, T., Baquero-Artigao, F., & Miguel, M. G. (2010). Leishmaniasis cutánea. *Pediatría Atención Primaria*, 12(46), 263-271. <https://www.redalyc.org/pdf/3666/366638723008.pdf>

eBioMedicine (2023). *Leishmania*: an urgent need for new treatments. *EBioMedicine*, 87, 104440. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104440>

Escudero, J.M (2015). Actividad y modo de acción leishmanicida de nuevos derivados de la podofilotoxina y quinonas. [Tesi doctoral, Universidad de León]. [https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/5144/tesis\\_5d262d%20\(1\).PDF?sequence=1](https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/5144/tesis_5d262d%20(1).PDF?sequence=1)

Fernández, D. (2017, 6 de Noviembre). Madrid mata 29.000 conejos para combatir la 'leishmaniasis': 677 personas infectadas. *El Confidencial*. [https://www.elconfidencial.com/espana/madrid/2017-11-06/leishmaniasis-conejos-madrid-infeccion-es-humanos\\_1471455/](https://www.elconfidencial.com/espana/madrid/2017-11-06/leishmaniasis-conejos-madrid-infeccion-es-humanos_1471455/)

Gállego Berenguer, G. J. (2007). Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 3a edición. Barcelona: Universitat de Barcelona. 2007. Universitat de Barcelona.

Gomez-Barroso, D., Herrador, Z., San Martín, J. V., Gherasim, A., Aguado, M., Romero-Mate, A., Molina, L., Aparicio, P., & Benito, A. (2015). Spatial distribution and cluster analysis of a leishmaniasis outbreak in the south-western Madrid region, Spain, September 2009 to April 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 20(7), 11–20. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.7.21037>

Gontijo, B., & de Carvalho, M.deL. (2003). Leishmaniose tegumentar americana [American cutaneous leishmaniasis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1), 71–80. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822003000100011>

González, E., Álvarez, A., Ruiz, S., Molina, R., & Jiménez, M. (2017). Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR. *Acta tropica*, 171, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.023>

González, E., Gállego, M., Molina, R., Abras, A., Alcover, M. M., Ballart, C., Fernández, A., & Jiménez, M. (2015). Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome b gene. *Acta tropica*, 152, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020>

González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., & Molina, R. (2017). Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. *Parasites & vectors*, 10(1), 368. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2309-z>

González, E., Molina, R., Aldea, I., Iriso, A., Tello, A., & Jiménez, M. (2020). *Leishmania* sp. detection and blood-feeding behaviour of *Sergentomyia minuta* collected in the human leishmaniasis focus of southwestern Madrid, Spain (2012-2017). *Transboundary and emerging diseases*, 67(3), 1393–1400. <https://doi.org/10.1111/tbed.13464>

González, E., Molina, R., Iriso, A., Ruiz, S., Aldea, I., Tello, A., Fernández, D., & Jiménez, M. (2021). Opportunistic feeding behaviour and *Leishmania infantum* detection in *Phlebotomus perniciosus* females collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain (2012-2018). *PLoS neglected tropical diseases*, 15(3), e0009240. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009240>

Horrillo, L., Castro, A., Matía, B., Molina, L., García-Martínez, J., Jaqueti, J., García-Arata, I., Carrillo, E., Moreno, J., Ruiz-Giardin, J. M., & San Martín, J. (2019). Clinical aspects of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum* in adults. Ten years of experience of the largest outbreak in Europe: what have we learned?. *Parasites & vectors*, 12(1), 359. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3628-z>

Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., & Molina, R. (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?. *Veterinary parasitology*, 202(3-4), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027>

Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & vectors*, 10(1), 287. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>

Kumar, R., & Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 3, 251. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>

Le Rutte, E. A., van der Wilt, L. S., Bulstra, C. A., Nieboer, D., Kontoroupis, P., de Vlas, S. J., & Richardus, J. H. (2021). Incidence and geographical distribution of canine leishmaniosis in 2016-2017 in Spain and France. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 25, 100613. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100613>

Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E., & Englund, P. T. (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in parasitology*, 21(8), 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.008>

Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, 27(2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>

Martín-Martín, I., Molina, R., Rohoušová, I., Drahota, J., Volf, P., & Jiménez, M. (2014). High levels of anti-Phlebotomus perniciosus saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. *Veterinary parasitology*, 202(3-4), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.045>

Ministeri de Ciència i Investigació del govern d'Espanya: [file:///F:/Descargas/CientificasenCifras2021\\_ResumenEjecutivo.pdf](file:///F:/Descargas/CientificasenCifras2021_ResumenEjecutivo.pdf)

Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., & Bernal, J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary parasitology*, 190(1-2), 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>

Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toraño, A., Goyache, J., Vilas, F., Domínguez, L., & Domínguez, M. (2014). Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Veterinary parasitology*, 199(3-4), 264–267. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.010>

National Research Council (US) and Institute of Medicine (US) Committee on the Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research. Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research. Washington (DC): National Academies Press (US); 1988. Executive Summary. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218267/>

Rapport D. J. (2007). Sustainability science: an ecohealth perspective. *Sustainability science*, 2(1), 77–84. <https://doi.org/10.1007/s11625-006-0016-3>

Reckelhoff J. F. (2023). Is My Study Sex or Is it Gender?. *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979), 80(3), 497–499. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.20745>

Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., & Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 65(3), 111–125. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111>

Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E., & Gortázar, C. (2013). *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18(30), 20541. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20541>

Sanjuan, N. (2018). Facultad de Medicina UBA (Universidad de Buenos Aires): Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología (Primera Catedra): *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2019-05/SEMINARIO%2019.pdf>

Serafim, T. D., Iniguez, E., & Oliveira, F. (2020). *Leishmania infantum*. *Trends in parasitology*, 36(1), 80–81. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.006>

Sevá, A. D. P., Martcheva, M., Tuncer, N., Fontana, I., Carrillo, E., Moreno, J., & Keesling, J. (2017). Efficacies of prevention and control measures applied during an outbreak in Southwest Madrid, Spain. *PloS one*, 12(10), e0186372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186372>

Souza W.d (2008). Electron microscopy of trypanosomes--a historical view. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(4), 313–325. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000400001>

Srivastava, P., Dayama, A., Mehrotra, S., & Sundar, S. (2011). Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>

Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M. J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J., & Amela Heras, C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. *Revista española de salud publica*, 86(6), 555–564. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272012000600002>

Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F., & de Souza, W. (2013). The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003594. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003594>

Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology*, 44(2), 253–272. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>

Wikimedia Commons (2006).  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?search=pappatasi&title=Special:MediaSearch&go=Go&type=image>

Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J. P., & Bastien, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic acids research*, 24(9), 1688–1694.  
<https://doi.org/10.1093/nar/24.9.1688>

World Health Organization (WHO) (2023)  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Geneva: WHO; 2010. WHO technical report series; no. 949. Available from:  
[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)