

Importancia actual de las leishmaniosis en España

The current importance of Leishmaniasis in Spain

MORILLAS, F.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; SANCHÍS-MARÍN, M. C. *
Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071
Granada. España.

* Departamento Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Almería.

RESUMEN

Se pasa revisión al estado actual de los principales elementos epidemiológicos de las leishmaniosis en España: parásito, reservorio canino, flebotomo vector, y hombre, poniendo de manifiesto la importancia sanitaria, social y económica de la enfermedad. Se termina recogiendo datos recientes sobre el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Palabras claves: *Leishmania infantum*. Perro. Flebotomo. España.

ABSTRACT

A revision is made of the current state of the principal epidemiological elements of leishmaniasis in Spain (the parasite, the canine population, the sandflies vector, and humans), while stating the sanitary, social and economic significance of the disease. Finally, recent information is given regarding the diagnosis and treatment of the disease.

Key words: *Leishmania infantum*. Dog. Phlebotomine sandflies. Spain.

Recibido: 19-2-95.

Aceptado: 14-3-95.

BIBLID [0004-2927(1995) 36:1; 19-40]

INTRODUCCIÓN

Aunque las Leishmaniosis y sus agentes etiológicos, las distintas especies del género *Leishmania*, son conocidos con bastante precisión desde principios de siglo y se cuentan por miles el número de artículos realizados por especialistas sobre el tema, aún siguen siendo un verdadero problema de salud humana y animal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) las ha considerado, desde 1977, como una de las seis enfermedades a las que hay que dar prioridad en los planes de Investigación, y recientemente ha llamado la atención, en varias

ocasiones, sobre el problema al denunciar los brotes epidémicos que aparecen en los países del tercer mundo, en donde la enfermedad deja graves secuelas de desastre, miseria y muerte.

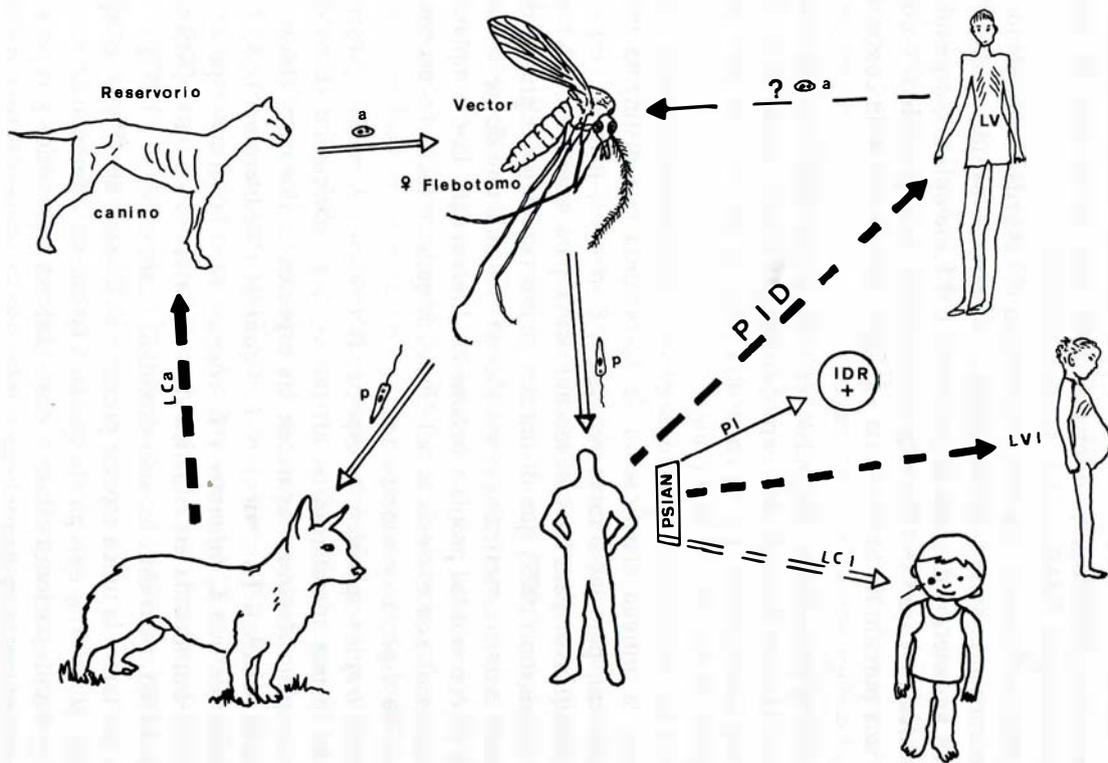
En España, y en general en los países europeos del Mediterráneo, el problema es un poco diferente ya que la enfermedad ha cursado de forma endémica: un no muy importante pero constante número de casos, adscritos principalmente a la Costa Mediterránea y área Centro del país. Desde 1982 a 1992, las Leishmaniosis han sido de declaración obligatoria y el número de casos denunciados anualmente ha estado en torno al centenar (Bes, 1982-1992); sin embargo el subregistro ha sido comprobado (Reyes Magaña *et al.*, 1988), por lo que si el número de casos declarados lo multiplicamos por 2 o por 3 quizás estemos mas próximos a la realidad.

La importancia actual de la Leishmaniosis ha aumentado de forma considerable, principalmente por tres motivos: a) El alto número de casos de Leishmaniosis visceral en personas inmunodeprimidas, sobre todo individuos VIH+. b) La constante denuncia de casos en turistas extranjeros. c) La cada vez mayor importancia social y económica del perro, que es el animal reservorio y que presenta prevalencias de enfermedad del 10-20% con gran frecuencia.

CICLO BIOLÓGICO (Lámina 1)

El ciclo biológico de *Leishmania* se desarrolla entre un animal vertebrado y un hospedador invertebrado. El hospedador vertebrado (reservorio) varía según la especie de *Leishmania*, pero normalmente es un roedor o un cánido. El hospedador invertebrado (vector) son dípteros Nematóceros de la familia *Phlebotomidae* (flebotomos). Este vector al picar sobre un reservorio parasitado se infecta; cuando al cabo de unos días vuelve a picar a otro hospedador vertebrado, le transmite el parásito, que puede causar la enfermedad (leishmaniosis). Si este último hospedador es el hombre, se infecta e igualmente puede sufrir la leishmaniosis.

Este ciclo general puede tener diversas variantes, principalmente en función de las condiciones ecológicas de la zona, y dar lugar así a diferentes situaciones epidemiológicas de la enfermedad. En el caso concreto de España, el agente etiológico es *Leishmania infantum*, el reservorio es el perro, y la función vectorial la realizan las especies *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi*. El hombre que se infecta por *Leishmania* normalmente no desarrolla la enfermedad al desarrollar una Respuesta Inmune celular adecuada. Sin embargo, sobre todo en niños, a veces desarrolla una Leishmaniosis cutánea o visceral. Últimamente el mayor número de casos de Leishmaniosis visceral se produce en las personas inmunodeprimidas, entre las que principalmente se encuentran los individuos VIH+.



Lám. 1.—Ciclo natural de *Leishmania infantum* en España. Perro, flebotomo y hombre son los hospedadores donde principalmente vive el parásito. El perro infectado normalmente pasa a perro enfermo con síntomas, y hace de reservorio. El hombre, sin embargo, habitualmente es resistente (IDR+), pero a veces padece LV o LC (principalmente niños); últimamente el mayor número de casos de LV se da en las personas inmunodeprimidas (PID), que, tal vez, puedan hacer también de reservorio. PSIAN = personas con sistema inmune aparentemente normal. IDR = Intradermorreacción de Montenegro. a = Amastigote; p = promastigote.

EL PARÁSITO (Láminas 1 y 2a,b)

Como ya hemos dicho, los agentes etiológicos de las Leishmaniosis son las diferentes especies y subespecies del género *Leishmania*, que son protozoos flagelados del orden *Kinetoplastida* y familia *Trypanosomatidae*. Estos parásitos presentan dos aspectos morfológicos diferentes a lo largo de su ciclo de vida: amastigote y promastigote (Molyneux y Ashford, 1985).

Forma Amastigote (Lámina 2a): presente sólo en el hospedador vertebrado, normalmente se encuentra dentro del macrófago. De aspecto ovoide y con 3-5 μ de longitud, en su interior destaca la presencia del Kinetoplasto, orgánulo más pequeño, esférico y que se tiñe más intensamente que el núcleo, y que no es más que una porción de Mitocondria en cuyo interior hay gran cantidad de ADN.

Forma Promastigote (Lámina 2b): puede recordar a una zanahoria, pero con un solo flagelo en la parte anterior del cuerpo; su longitud aproximada es de 15 μ . También posee Kinetoplasto que se encuentra entre el núcleo y la base del flagelo. Esta forma se da sólo en el Vector.

Se han citado un considerable número de especies y subespecies, por lo que hay que desechar la antigua clasificación de *Leishmania* que distinguía tres especies (*L. donovani*, para las formas viscerales; *L. tropica*, para las formas cutáneas; y *L. braziliensis*, para las cutáneo-mucosas), para seguir los criterios de Zuckerman y Lainson (1977) que distinguen cuatro complejos o grupos de especies (*donovani*, *tropica*, *mexicana* y *braziliensis*) en cada uno de los cuales hay varias especies con entidad propia y netamente diferenciada. Los complejos *mexicana* y *braziliensis* son exclusivos del Nuevo Mundo, e incluyen un considerable número de especies y subespecies.

En el complejo *tropica* aparecen las especies *L. tropica* y *L. major* (presentes ambas en los países mediterráneos africanos), y *L. aethiopica* (Este de África). En el complejo *donovani* aparecen las especies *L. donovani* (India y Este de África), *L. chagasi* (América), y *L. infantum* (Mediterráneo). Se ha emitido la hipótesis de que *L. infantum* y *L. chagasi* sean la misma especie y que la primera fue introducida en América durante la época colonial (Killick Kendrick *et al.*, 1980), pero esto ha sido discutido (Lainson *et al.*, 1987).

En España, por tanto, la única especie presente es *L. infantum* (Portus *et al.*, 1986; Jiménez *et al.*, 1991), que puede quedar claramente diferenciada de *L. donovani* por sus manifestaciones clínicas, hospedadores reservorios y especies vectores, y en consecuencia epidemiología (OMS, 1984), ultraestructura, densidad de ADN, y zimogramas (Moreno *et al.*, 1986). La diferenciación entre *L. infantum* y *L. donovani* se ha realizado sobre todo en base a estos últimos: la diferente movilidad electroforética de la enzima Glutamato oxal-acetato transaminasa (GOT), que presenta valores constantes en cada una de las dos especies, permite una fácil identificación.

La técnica empleada para la obtención de los zimogramas es la electroforesis de isoenzimas, que normalmente es realizada sobre gel de almidón. El número de enzimas estudiados puede ser diferente en función del grupo de investigación, pero en general, y siguiendo las recomendaciones de la OMS y grupos de expertos (Evans, 1989; Rioux, 1986) se deben estudiar numerosas enzimas, entre las que destacan: ICD, MDH, ME, G₆PD, NP(NP₁ y NP₂), GOT(GOT₁ y GOT₂), FH, GPI, MPI, PGD, GluD, PGM y DIA.

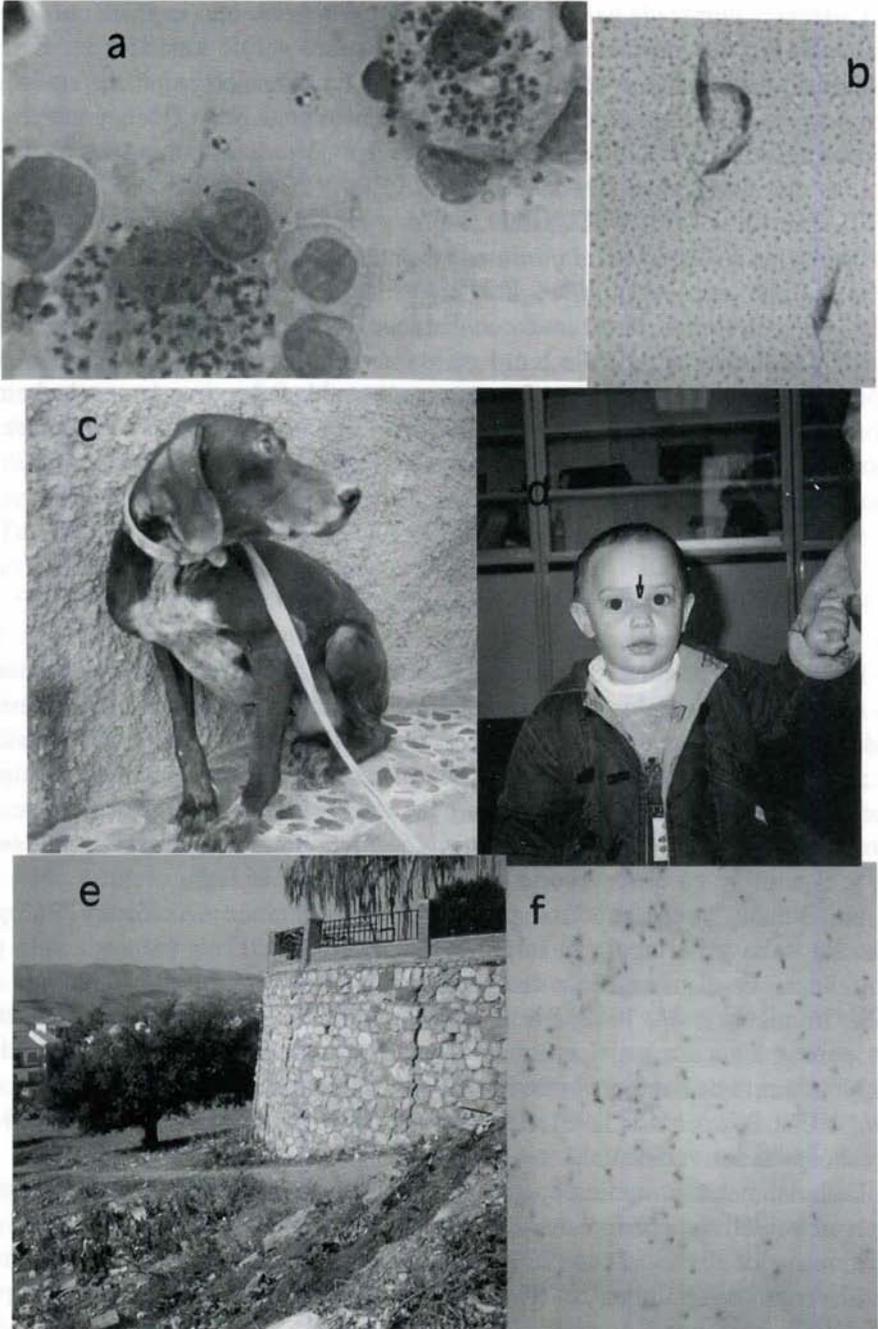
Dentro de la especie *L. infantum*, y usando la técnica electroforética, se ha observado una gran variabilidad, habiéndose descrito 25 zimodemos diferentes, de los que 19 se han encontrado en España. En Andalucía Oriental nosotros (Martín Sánchez *et al.*, 1994 a,b,c) hemos encontrado 16 zimodemos, y de ellos 8 son exclusivos de este área. La mayor diversidad de zimodemos la hemos encontrado en el vector (15 zimodemos en 43 cepas tipificadas) y hombre (4 zimodemos en 8 cepas), mientras que en el perro sólo se han encontrado 2 zimodemos en 72 cepas tipificadas.

EL RESERVORIO (Láminas 1 y 2c)

Un considerable número de animales vertebrados se han encontrado parasitados por *Leishmania*, pero los que principalmente realizan el papel de reservorios (OMS, 1984) son los cánidos y los roedores. Mamíferos como los Edentados, o el propio hombre, pueden hacer de reservorio según la situación epidemiológica concreta, o la especie de *Leishmania* de que se trate. Así, por ejemplo, el "perezoso" o "perico ligero" (*Choloepus hoffmanni*) alberga a *L. braziliensis* ssp, y el hombre es el reservorio de *L. donovani* en la India.

En España, y en los otros países del Mediterráneo Occidental Europeo (Francia, Italia y Portugal), el reservorio de la leishmaniosis (causada sólo por *L. infantum*) es el perro. El zorro ha sido encontrado infectado (Rioux *et al.*, 1968; Gramiccia *et al.*, 1982; Abranches *et al.*, 1982; Marín Iniesta *et al.*, 1982) pero parece jugar un papel secundario en la epidemiología de la enfermedad. También la rata de campo (*Rattus rattus*) ha sido encontrada infectada (Petrovic *et al.*, 1978; Pozio *et al.*, 1981; Morillas *et al.*, 1985) pero su papel sería el de mero hospedador accidental.

La Leishmaniosis canina cursa con una serie de síntomas que normalmente aparecen paulatina pero inexorablemente hasta causar la muerte del animal por caquexia o por diversas complicaciones, y aun a pesar del tratamiento. Entre otros, los síntomas (Lámina 2c) (Reyes Magaña *et al.*, 1989; Hernández Rodríguez *et al.*, 1987; Martínez Gómez *et al.*, 1982; Fisa *et al.*, 1992; Tesouro *et al.*, 1982; Longstaffe y Guy, 1985) son: pérdida de brillo del pelo, queratitis, depilaciones por zonas, ulceraciones en piel y mucosas oral y nasal y córnea, conjuntivitis y pérdida de visión, epistaxis, onicogriposis, adenopatía generalizada, pancitopenia,



Lám. 2.—a) amastigotes, dentro y fuera de macrófagos, b) promastigotes, c) perro con Leishmaniosis, d) niño con Botón de Oriente en la nariz, e) muro con grietas y barbacanas donde se alojan los flebotomos, f) flebotomos capturados sobre una trampa adhesiva.

inversión de la razón albúmina/globulina, aspecto triste y envejecido, hepato y esplenomegalia, amiloidosis, delgadez progresiva hasta la caquexia.

En los últimos años, un considerable número de encuestas se han realizado en España a fin de determinar la prevalencia de la Leishmaniosis canina. Dichos estudios han puesto de manifiesto que no son raras las sero-prevalencias del 10-20% (Botet *et al.*, 1990; Reyes *et al.*, 1988; Segovia y Martín Luengo, 1985; Gómez Nieto *et al.*, 1992; Martínez Cruz *et al.*, 1990; Morillas *et al.*, 1992). En varias encuestas realizadas al azar por nosotros en Andalucía Oriental hemos encontrado cifras igualmente importantes: 13,5% en la provincia de Almería, y 25% en el área de Turre; 8,84% en la de Granada y 15,4% en el matiz Mesomediterráneo (zona de Torvizcón) de la Alpujarra; 34,7% en la Axarquía malagueña. Por otro lado, en prácticamente todos los pueblos y urbanizaciones que rodean Granada capital hemos encontrado perros con leishmaniosis (Reyes Magaña *et al.*, 1989).

Parece que estos datos hablan por sí solos y son lo suficientemente elocuentes para demostrar la importancia actual de esta parasitosis en el perro.

EL VECTOR (Láminas 1 y 2f)

Se ha comprobado en numerosas ocasiones que las distintas especies del género *Leishmania* son transmitidas por un grupo de insectos, orden *Diptera*, suborden *Nematocera*, que pertenecen a la familia *Phlebotomidae* (flebotomos). No se ha comprobado la transmisión por otros artrópodos como pulgas, piojos, moscas, u otros Nematóceros que no pertenezcan a la familia *Phlebotomidae*. Los mosquitos comunes (familia *Culicidae*, con los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* entre otros), así como otros nematóceros hematófagos como los Simúlidos y Ceratopagónidos, tampoco transmiten *Leishmania*.

Igualmente sucede respecto a las garrapatas (Ixodidos). Este grupo se citó como vector de *Leishmania* en los años 30 (Blanc y Caminopetros, 1930) pero posteriormente no se ha corroborado tal hecho; al contrario, algunos autores han fallado al intentar infectar garrapatas con *Leishmania* al alimentarlas sobre perros con la enfermedad, mientras que en la misma experiencia sí se infectaron los flebotomos (Rioux *et al.*, 1974).

Los flebotomos son de pequeño tamaño (3-5 mm) por lo que son difíciles de ver. Tienen hábitos nocturnos y crepusculares, y vuelan a saltos. Su cuerpo está cubierto de pelos, y las alas, que forman ángulo de 45° con el cuerpo, son lanceoladas y con nerviaciones longitudinales características del grupo.

Se han descrito aproximadamente 700 especies, que se encuentran repartidas por toda la zona cálida y templada del globo. De las 700 especies, se han citado aproximadamente a 70 como vectores de *Leishmania*. Estas especies vectores pertenecen, salvo excepciones, a los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo)

y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). Dentro del género *Phlebotomus* se ha puesto de manifiesto una estrecha relación entre los subgéneros y la especie de *Leishmania* que transmiten. Así, *L. infantum* es transmitida por especies de los subgéneros *Larrousius* y *Adlerius*, *L. tropica* por especies de subgénero *Paraphlebotomus*, y *L. major* por las del subgénero *Phlebotomus*.

En España se han descrito 11 especies de flebotomos (Gil Collado *et al.*, 1988; Gallego *et al.*, 1992). Dos pertenecen al género *Sergentomyia*: *S. minuta*, la especie más ubicua pero que sólo es herpetófila, y *S. fallax*, que se encuentra en el Norte de África e Islas Canarias. Las otras 9 pertenecen al género *Phlebotomus*. Dentro de este último género, las especies *P. papatasi* y *P. sergenti*, aunque presentes en buena parte de la Península Ibérica, son poco abundantes excepto en algunos puntos concretos del Sudeste español (Sanchís Marín *et al.*, 1986a; Martínez Ortega *et al.*, 1991), por lo que unido a la ausencia de *L. major* y *L. trópica* difícilmente ejercen papel vectorial alguno en España. Igual se puede decir de *P. alexandri*, *P. chabaudi* y *P. longicuspis*, que están presentes sólo en el área del Sudeste, y de *P. mascittii*, citada sólo en Cataluña. La especie *P. fortunatarum* es un endemismo de las Islas Canarias, donde es escasa y, además, no se ha comprobado la existencia de Leishmaniosis autóctonas.

Restan las especies *P. perniciosus* y *P. ariasi*, que sí han sido encontradas parasitadas por *L. infantum* en varias ocasiones (Rioux *et al.*, 1986; Lucientes *et al.*, 1988; Morillas *et al.*, 1992). La ubicuidad, abundancia y alto porcentaje de infección hacen que se les deba considerar, sin ningún tipo de dudas, como las especies vectoras de las Leishmaniosis en nuestro país.

Como dijimos anteriormente, los flebotomos tienen hábitos nocturnos mientras que durante el día permanecen en sus lugares de reposo: grietas del terreno, barbancas de muros de contención (Lámina 2e), rendijas, oquedades, o cualquier otro lugar que les proteja de la acción directa de los rayos solares, del exceso de luz y del viento, y, además, les proporcione un cierto grado de humedad. Las hembras son las únicas hematófagas y desarrollan un ciclo gonotrófico, al cabo del cual realizan la puesta de huevos (en torno a 50). Dicha puesta tiene lugar siempre *sobre un soporte sólido*, húmedo y con materia orgánica de origen animal o vegetal. Por tanto, *no se realiza la puesta de huevos sobre acúmulos de agua*, tal y como ocurre con otros Nematóceros (mosquitos comunes o culicidos, etc.). Igualmente, los estadios posteriores de desarrollo (larva y pupa) viven sobre los mismos o parecidos soportes sólidos de materia orgánica húmeda, pero nunca en acúmulos de agua. Así pues, *achacar la aparición de algunos casos de leishmaniosis a la existencia de una acequia, charca, río, pantano, piscina, alberca, o cualquier otro acúmulo de agua, en las inmediaciones de la vivienda del paciente, es totalmente erróneo*.

En nuestras investigaciones sobre los flebotomos del Sudeste de España hemos capturado más de 70.000 ejemplares, y las especies *P. perniciosus* y *P. ariasi* han sido las más abundantes, encontrándose en prácticamente las más de

100 estaciones muestreadas. Ambas especies presentan una curva anual de población con 2 picos (Morillas *et al.*, 1983; Sanchís Marín *et al.*, 1986b; Martínez Ortega *et al.*, 1987): uno al principio de la época cálida (mayo, junio) y otro al final (septiembre, octubre). Las máximas capturas son en estos últimos meses, en los que, además, el porcentaje de infección de *P. perniciosus* es del 3-5%. Es, por tanto, el final de la época cálida el período de máximo riesgo epidemiológico de contraer la enfermedad.

EL HOMBRE: ¿HOSPEDADOR ACCIDENTAL O RESERVORIO?

Leishmania produce en el hombre, principalmente, tres formas clínicas: la Leishmaniosis cutánea (o Botón de Oriente), la Leishmaniosis cutáneo-mucosa, y la Leishmaniosis visceral (o Kala-azar). Otras formas clínicas como la Leishmaniosis dérmica post Kala-azar, la Leishmaniosis recidivante, o la Leishmaniosis cutáneo-difusa, se consideran complicaciones de alguna de las anteriores, normalmente como consecuencia de fallo en el tratamiento o en el estado inmune del enfermo.

Clásicamente, las tres principales formas clínicas citadas se consideraban causadas por tres agentes etiológicos: *L. tropica* (formas cutáneas), *L. braziliensis* (cutáneo-mucosas), y *L. donovani* (formas viscerales), pero, como ya hemos comentado, nada hay más lejos de la realidad; así, por ejemplo, una leishmaniosis cutánea puede estar producida por *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, varias de las especies o subespecies de los complejos *mexicana* y *braziliensis*, y por *L. infantum*.

Leishmaniosis cutánea (LC, Lámina 2d)

La forma más frecuente es el llamado Botón de Oriente, que se caracteriza por ser una lesión de 1-2 cm de diámetro en el lugar de la picadura del flebotomo. Su inicio tiene forma de pápula o nódulo pero posteriormente se úlcera en el centro, mientras que los bordes aparecen elevados e indurados. Posteriormente la úlcera se puede cubrir de costra y aumentar de tamaño adquiriendo aspectos más variados. Aunque ésta es la forma típica, la realidad es que las Leishmaniosis cutáneas son muy polimórficas; así, se distingue entre forma seca (de aspecto costroso y atribuidos a *L. tropica*) y húmeda (producida por *L. major*); otras formas recuerdan a diversos tipos de lepra, tuberculosis o lupus, dando las leishmaniosis cutáneas lepromatosa, seudotuberculosa y lupoide (Delgado *et al.*, 1984; Sánchez Vizcaíno *et al.*, 1993); otras lesiones, producidas por *L. aethiopica* y los complejos *mexicana* y *braziliensis*, suelen ser de tamaño netamente superior (4-5 cm de diámetro).

En España la Leishmaniosis cutánea ha sido y es bastante frecuente, dándose principalmente en zonas endémicas donde suele ser bien conocida por la población residente, y donde reciben nombres tan típicos como el de “pupa viva” (Alpujarra) o “enfermedad del mosquito” (Axarquía malagueña). La mayoría de los casos se dan en niños, y, en general, toda lesión, sea pápula, nódulo o úlcera, en cara o extremidades con un período de evolución superior a 1-2 meses debe ser considerada sospechosa de la enfermedad, y por lo tanto se debe dirigir el diagnóstico en este sentido.

En las zonas endémicas las tasas de incidencia son netamente superiores al resto del territorio: así Sánchez Reina *et al.* (1986) obtienen una incidencia en la Axarquía malagueña más de 100 veces superior a la de toda España; en la Alpujarra (provincia de Granada), Alcalde Alonso *et al.* (1989) obtienen incidencia de $13,5 \times 10^{-5}$ frente al $0,83 \times 10^{-5}$ provincial. Estas cifras corresponden a los quizás únicos estudios que se han realizado de forma exhaustiva y rigurosa sobre la incidencia de la enfermedad. Sin embargo determinar este parámetro en España es sumamente difícil pues, aunque durante 10 años ha sido de Declaración Nacional Obligatoria, el subregistro ha sido comprobado. Aun multiplicando por 2 o por 3 el centenar de casos declarados, obtenemos cifras de incidencia que epidemiológicamente no concuerdan con la alta prevalencia en el reservorio y el alto grado de infección del vector.

Sin embargo, si en vez de tener en cuenta el número de casos de la enfermedad se estudia el contacto *Leishmania*-hombre, aparece una mayor concordancia epidemiológica. En dos investigaciones llevadas a cabo sobre esta cuestión (contacto *Leishmania*-hombre) en las comarcas de las Alpujarras (Acedo Sánchez *et al.*, aceptado) y la Axarquía (Morillas *et al.*, datos no publicados), sobre la población infantil principalmente, mediante la Intradermorreacción (IDR) de Montenegro, se obtiene que entre el 40-50% de la población analizada ha tenido contacto con el parásito, y no ha desarrollado síntoma alguno de la enfermedad.

Con estas últimas cifras, la concordancia epidemiológica es casi perfecta: reservorio con alta prevalencia (10-20%) y mayor porcentaje aún de serología positiva frente al parásito (60-70%); vector muy abundante y con alto grado de infección (3-5%); alto grado de contacto parásito-hombre, si bien este último sólo desarrolla enfermedad ocasionalmente.

Leishmaniosis cutáneo-mucosa

La leishmaniosis cutánea suele curar al cabo de 1-2 años aun cuando no se someta a tratamiento específico. Sin embargo, en algunos casos no se produce una cura definitiva sino que el parásito se metastiza a las mucosas bucal, nasal, faríngea, o esofágica y allí produce una serie de lesiones que pueden ser graves

para el individuo al tener efecto mutilante, e incluso llegar a producirle la muerte.

La Leishmaniosis cutáneo-mucosa más conocida y grave es la llamada "espundia" que es producida por *Leishmania braziliensis* y que se da en diversos países de Centro y Sudamérica. Esta enfermedad se produce al cabo de varios meses, e incluso a veces al cabo de varios años, de producirse una Leishmaniosis cutánea, y el efecto desfigurante y mutilante, junto con las infecciones bacterianas y la resistencia del parásito al tratamiento específico, pueden llegar a causar la muerte del individuo. En el Este de África también se han citado casos de Leishmaniosis cutáneo-mucosa producidos por *L. aethiopica*.

Igualmente en la Cuenca Mediterránea se han diagnosticado algunos casos de esta manifestación clínica, y son producidos por *L. infantum* (Rioux *et al.*, 1980; Alvar *et al.*, 1990; Bolzoni *et al.*, 1991).

Leishmaniosis Visceral (LV)

Se caracteriza por la localización del parásito en órganos internos. El hígado y bazo son los principalmente afectados, produciendo hepato y esplenomegalia; la médula ósea es otro órgano fuertemente atacado, y como consecuencia de ello se produce una alteración de prácticamente todos los valores hemáticos, con pancitopenia e inversión de la proporción albúmina/globulinas. Como consecuencia de la anemia, el individuo tiene aspecto pálido o céreo, y aparece fiebre alta (incluso 41 °C) de forma irregular tanto a lo largo del día, como a través de varios días. El adelgazamiento y decaimiento general pueden conducir a la muerte del individuo si no se le pone el tratamiento específico a tiempo.

En la actualidad se siguen produciendo brotes epidémicos de Leishmaniosis visceral en países del tercer mundo, como la India, Etiopía, Sudán, etc. Sin embargo, nada debe estar más lejos que pensar que la LV es una enfermedad del tercer mundo, ya que nunca ha sido totalmente erradicada de la Cuenca Mediterránea (incluidos los países europeos). En España, hasta hace unos años, los principalmente afectados eran los niños menores de 5 años (80% de los casos de Leishmaniosis Visceral) y el óbito se ha producido con más frecuencia de la que sería de desear (Muñoz *et al.*, 1982; Repiso *et al.*, 1977), quizás por un diagnóstico excesivamente tardío. Recientemente la enfermedad ha adquirido mayor importancia pues ha vuelto a ser un verdadero problema de salud debido al cambio que se ha producido en las condiciones socio-culturales y sanitarias de nuestra área (Lámina 1). Como consecuencia de ello ha habido un drástico incremento, durante los últimos años, del número de casos en las personas inmunodeprimidas: por un lado, están las personas en estas condiciones como consecuencia de un trasplante y no son raros los casos de enfermedad y óbito en estas circunstancias (Ma *et al.*, 1979; Broeckert *et al.*, 1979; Torregrosa *et*

al., 1993). Por otro lado, están los inmunodeprimidos como consecuencia de sufrir una infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Es ya abundante la bibliografía donde se citan casos de coinfección VIH/*Leishmania*: Blazquez *et al.*, 1987; Yebra *et al.*, 1988; Scaglia *et al.*, 1989; etc.

Igualmente, se ha puesto de manifiesto el drástico incremento de la enfermedad debido a estos pacientes. Así, por ejemplo: Medrano *et al.* (1992) pasan de diagnosticar 8 casos de LV en 1991 a 35 en 1992, como consecuencia del seguimiento exhaustivo de esta parasitosis en VIH+, y Dereure *et al.* (1994) observan una frecuencia del 7,2% en los VIH+. Nosotros hemos observado que la LV no se desarrolla en VIH+ hasta que no se produce una clara disminución en los valores de las cifras CD4+; cuando su valor es normal, no aparecen síntomas o éstos son muy inespecíficos, la serología suele ser negativa y los cultivos y médula ósea también; sin embargo, al estar las cifras de CD4+ por debajo de 200/mm³ comienzan a aparecer todo tipo de signos clínicos y el parásito no sólo está presente en la médula ósea sino también en la sangre periférica (Martínez *et al.*, 1993), y en piel aparentemente sana.

En los VIH+ que desarrollan la Leishmaniosis visceral se ponen de manifiesto los síntomas clínicos típicos indicados anteriormente, pero también se han observado otras lesiones y afectación de órganos que antes no se habían señalado. Así, el parásito se ha encontrado con frecuencia en todo el tracto digestivo, pulmones (Heudier *et al.*, 1993), riñones, parótidas, piel aparentemente sana y con lesiones o manifestaciones muy difusas, sangre periférica, etc. Especial importancia epidemiológica podría tener la presencia en sangre periférica. Efectivamente, al ser frecuente esta localización, los VIH+ con LV podrían hacer de reservorio del parásito y ya se ha comprobado (Molina *et al.*, 1992) que el vector se puede infectar por *Leishmania* a partir de dicha sangre. Otra cuestión que podría ser importante es la transmisión vía jeringuilla: muchos VIH+ son drogadictos y ha sido este hábito la causa de su enfermedad. Es posible que, en dichas jeringuillas, junto al VIH se inocule también *Leishmania*.

Ya comentamos, al hablar de la LC, el alto % de personas con IDR+. Surge así otra cuestión que epidemiológicamente puede ser importante: estas personas IDR+, ¿pueden desarrollar la enfermedad, al inmunodeprimirse, por ejemplo, debido a ser sometidas a trasplante de órganos y sin necesidad de infectarse de nuevo? Datos como los indicados por Ma *et al.* (1979) en un paciente austriaco procedente de Malta, o como los observados por Aragot de Rossell *et al.* (1992) en animales de experimentación, así parecen indicarlo. La cuestión no es meramente teórica, y parecería lógico que a las personas que se les va a hacer trasplante de órganos, y por tanto van a ser sometidos a tratamiento inmunosupresor, se les ponga la Intradermorreacción de Montenegro para que, caso de ser positivos, estar prevenidos ante la posible aparición de Leishmaniosis.

Finalmente cabe señalar la importancia económica que puede tener la enfermedad en España, un país donde el turismo es una de las actividades más

relevantes. No son pocos los turistas que tras pasar sus vacaciones en nuestra tierra, a los pocos meses de volver a sus lugares de origen desarrollan, o bien ellos, o sus animales de compañía (perros), la enfermedad (Longstaffe y Guy, 1985; Cabie *et al.*, 1992; Jokiph *et al.*, 1992; Granert *et al.*, 1993). No es precisamente el mejor recuerdo. Valorar la importancia económico-turística de la enfermedad es difícil, máxime si hay que tener en cuenta que los otros países mediterráneos competidores (incluida la Costa Azul francesa) presentan el mismo problema. En cualquier caso, encontrar en una pequeña aldea, de apenas 100 habitantes, de la Axarquía malagueña, tres niños extranjeros que han sufrido Leishmaniosis Visceral no es la mejor tarjeta de presentación, aun cuando estos niños se hayan podido infectar también en otros países mediterráneos.

DIAGNÓSTICO

Leishmaniosis cutánea humana

Se basa en la observación directa de las formas amastigotas del parásito (Lámina 2a). Para ello, habrá que realizar la toma de muestra de la lesión; esto se puede hacer de varias formas, si bien debe ser del borde (zona indurada) y no del centro de la úlcera y procurando que haya la mínima sangre posible. Una vez tomada la muestra se hacen improntas con la misma, o se siembran en medio de cultivo adecuado (NNN), o se inoculan en animales de experimentación (hamsters o ratones Balb/c). Las improntas se fijarán con metanol durante breve tiempo (30 seg-1 min) y después se teñirán con Giemsa. Las formas de tomar la muestra pueden ser (Evans, 1989):

- 1) *Raspado*: tras levantar la costra, raspar con un bisturí sin hacer sangre y procurando que salga serosidad. Con ella se harán tantas improntas como sea necesario.
- 2) *Corte*: tomar el borde de la lesión entre el dedo índice y pulgar. Presionar hasta que la zona presionada se ponga blanca. Dar un corte de 0,5 mm de profundidad con el bisturí; saldrá serosidad, que se usará para hacer la impronta. Se puede raspar también sobre el corte.
- 3) *Aspirado* (Vouldoukis *et al.*, 1987): tomar una jeringa de insulina con un poco de suero fisiológico. Pinchar en el borde de la lesión de forma que el extremo de la aguja vaya al centro de la zona indurada. Girar la jeringa sobre sí misma y aspirar varias veces hasta que entre serosidad en ella. Hacer improntas, sembrar en medio de cultivo adecuado o inocular en animal adecuado.
- 4) *Biopsia*: es el mejor método, ya que se dispone de más material para

hacer improntas y sembrar en medio de cultivo. La realización con "Biopsy punch" de 4 mm de diámetro proporciona suficiente material y permite una perfecta cicatrización sin necesidad de dar puntos, por lo que sería la más aconsejable.

Leishmaniosis visceral humana

El diagnóstico puede ser directo o indirecto.

Directo: habrá que observar las formas amastigotas del parásito y la toma de muestra se puede hacer de algún órgano afectado. El principalmente usado es la punción de médula ósea, de esternón en adultos y de cresta ilíaca en niños. Mayor sensibilidad tiene la punción de bazo pero es mucho más peligrosa por los riesgos de hemorragia que conlleva. Tras la obtención de la muestra se hará frotis y tinción con Giemsa. También se pueden hacer cultivos e inocular animales de experimentación.

Indirecto: un considerable número de pruebas inmunológicas se han usado (OMS, 1984, 1994; Mengistu *et al.*, 1993). Las más recomendadas por su sensibilidad y especificidad son la IFI y la ELISA. La CIEP parece ser más específica pero menos sensible. Posteriormente se ha usado la Aglutinación directa (El-Harith *et al.*, 1986; Singla *et al.*, 1993) también con buenos resultados. Igualmente, se han puesto a punto diversas variantes de la ELISA, tales como Dot-ELISA (Fisa *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1991; Ashford *et al.*, 1993).

El problema de estas técnicas es la posibilidad de reacciones cruzadas con otras enfermedades, sean parasitarias (trypanosomiasis, paludismo, schistomiasis), o no (autoinmunes y linfoproliferativas), por lo que hay que valorar adecuadamente el valor de los títulos de estas pruebas serológicas. Recientemente se ha usado el Inmunoblot (Mary *et al.*, 1992; Rolland *et al.*, 1992; Hoerauf *et al.*, 1992); esta técnica se ha mostrado hasta 10^3 veces más sensible que la IFI, por lo que puede ser aconsejable para el diagnóstico en inmunodeprimidos, pero también ha dado positivo en personas residentes en zonas endémicas que nunca han tenido síntomas de la enfermedad.

En las *personas inmunodeprimidas* las técnicas de diagnóstico sufren algunas modificaciones. Así, por ejemplo, es frecuente que la serología sea negativa, mientras que el parásito puede observarse con relativa facilidad en la médula ósea o en la biopsia de cualquier órgano afectado. No es raro que se vea en sangre (Martínez *et al.*, 1993), tras un frotis normal o, mejor aún, tras leucoconcentración (Izri *et al.*, 1993). El xenodiagnóstico con flebotomos de cultivo ha demostrado una mayor sensibilidad que la serología y diagnóstico directo en estos pacientes (Molina *et al.*, 1992).

Últimamente se está poniendo a punto el diagnóstico mediante la tecnología

de Sondas y PCR, que muestra una especificidad y sensibilidad muy superior a las empleadas hasta ahora (Smith *et al.*, 1992; Gramiccia *et al.*, 1992; Ben Ismail *et al.* 1992; El Hassam *et al.*, 1993).

Leishmaniosis canina

Directo: tras la toma de muestra de lesión de piel, de ganglio (normalmente poplíteo) o de médula ósea.

Indirecto: varias pruebas serológicas (Portus, 1987; Tesauro *et al.*, 1992) entre las que destaca la IFI, considerada como técnica de referencia por la OMS. El título umbral para esta técnica se establece en 1/80-1/160. Otras técnicas como ELISA y sus variantes han sido usadas, y alguna de ellas comercializada.

TRATAMIENTO

El producto indicado es el Antimonio pentavalente, que en España esta comercializado bajo el nombre de "Glucantime". Éste es efectivo para la Leishmaniosis visceral humana, pero tiene poca eficacia en la Leishmaniosis canina.

Cuando falla este producto se utilizan una serie de compuestos que han sido recogidos recientemente en 2 revisiones: Davidson y Croft, 1993; Olliaro y Bryceson, 1993.

La pentamidina, el alupurinol, Anfotericina B, Rifampicina, Ketoconazol, etc., son productos empleados que tienen eficacia en determinadas condiciones. Últimamente se está usando la Anfotericina B en liposomas (Martino *et al.*, 1993) así como la inmunoterapia con γ -interferon, pero aún deben ser contrastados suficientemente. El tratamiento sinérgico (por ejemplo, Glucantime + alupurinol; alupurinol + levamisol; etc.), también se está empleando pero los resultados deben ser valorados concienzudamente.

En la Leishmaniosis cutánea humana se está empleando la crioterapia con CO₂ sólido o N₂ líquido y da muy buen resultado si la lesión no es muy extensa: en una sola sesión de tratamiento, de 30 seg-1 min, puede curarse el botón y sin que apenas quede cicatriz del mismo (Alcalde Alonso *et al.*, 1989).

REFERENCIAS

- ABRANCHES, P.; CONCEICAO-SILVA, F. M.; SANTOS GÓMEZ, G. M.; JANZ, J. B. (1991). "Canine leishmaniasis: pathological and epidemiological factors influencing transmission of infection". *J. Parasitol.*, **77**:557-61.
- ACEDO SÁNCHEZ, C.; MARTÍN SÁNCHEZ, J.; VÉLEZ BERNAL, I. D.; SANCHIZ MARÍN, M. C.; LOUASSINI, M.; MALDONADO, J. A. & MORILLAS MÁRQUEZ, F. (1994). "Leishmaniosis Eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, Southern Spain)". *Inter. J. Parasit.* (aceptado).
- ALCALDE ALONSO, M.; DELGADO, V.; GUTIÉRREZ SALMERÓN, M. & NARANJO, R. (1989a). "Leishmaniosis cutánea: alternativa terapéutica al glucantime". *Act. Dermo. Sif.*, **80**:259-66.
- ALCALDE ALONSO, M.; MORILLAS MÁRQUEZ, F.; DELGADO FLORENCIO, V. & NARANJO SINTES, R. (1989b). "Epidemiología de la leishmaniosis cutánea en la provincia de Granada". *Actas Dermo-sif.*, **80**:251-254.
- ALVAR, J. (1994). "Leishmaniasis and AIDS co-infection: the spanish example". *Parasit. Today*, **10**:160-63.
- ALVAR, J.; BALLESTEROS, J. A.; SOLER, R.; BENITO, A.; VAN EYS, G.; SCHOONE, G. & CABRER, B. (1990). "Mucocutaneous leishmaniosis due to *Leishmania infantum*: Biochemical characterization". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **43**:614-18.
- ARAGOT DE ROSSELL, R.; DURÁN, R. J.; ROSSELL, O. & RODRÍGUEZ, A. M. (1992). "Is leishmaniasis ever cured?". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**:251-253.
- ASHFORD, D. A.; BADARO, R.; EULALIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C.; ZALIS, M. & DAVID, J. R. (1993). "Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test ELISA (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **48**:1-8.
- BEN ISMAIL, R.; SMITH, D. F.; READY, P. D.; AYADI, A.; GRAMICCIA, M. & BEN OSSMAN BEN RACHID, M. S. (1992). "Sporadic cutaneous leishmaniasis in North Tunisia: identification of the causative agent *Leishmania infantum* by the use of a diagnostic DNA probe". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**:508-10.
- BES. *Boletín Epidemiológico Semanal* 1982-1992. M.º de Sanidad y Consumo. Madrid.
- BETTINI, S.; POZIO, E. & GRADONI, L. (1980). "Leishmaniasis in Tuscan (Italy). II. *Leishmania* from wild rodentia and carnivora in a human and canine leishmaniasis focus". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **74**:77-83.
- BETTINI, S.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. & ATZENI, M. C. (1986). "Leishmaniosis in Sardinia. II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* by *Leishmania infantum* in the province of Cagliari". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **80**:458-59.
- BLANC, G. & CAMINOPETROS, J. (1930). "La transmission du Kala-azar méditerranéen par une tique: *Rhipicephalus sanguineus* C. R". *Acad. Sci. Paris*, **191**:1162-64.
- BLÁZQUEZ, J.; ALVAR, J. & NAJERA, R. (1987). "Leishmaniasis in HIV (LA-VIH-TL VIII) serologically positive patient". *J. Infect.*, **14**:89-80.
- BORZONI, F.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; MANCIONI, A.; VALDÉS, E. & LODDO, S. (1991). "A case of lingual and palatine localization of a viscerotropic *Leishmania infantum* zymodeme in Sardinia, Italy". *Trop. Med. Parasitol.*, **42**:193-94.
- BOTET, J.; SERRA, J.; PORTUS, M.; MORA, R. & GALLEGO, M. (1987). "Incidencia de la leishmaniosis en el área de Barcelona". *Rev. Iber. Parasitol.*, vol. extr., pp. 51-54.
- BROECKAERT, A.; MICHELSEN, P. & VANDEPITTE, J. (1979). "Fatal leishmaniasis in renal transplant patient". *Lancet*, ii:740-41.
- CABIÉ, A.; MATHERON, S. A.; LEPRETRE, A.; BOUCHAUD, O.; DELUD, A. M. & COULAND, *Ars Pharmaceutica*, **36**:1; 19-40, 1995

- J. P. (1992). "Leishmaniose viscerale au cours de l'infection por le VIH. Une infection opportuniste à part entiere". *Pres. Med.*, **21**:1658-62.
- DAVIDSON, R. N. & CROFT, S. L. (1993). "Recent advances in the treatement of visceral leishmanioses". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**:130-31.
- DELGADO, V.; ALCALDE, M. & NARANJO, R. (1984). "Leishmaniosis cutánea pseudotuberculosis". *Laboratorio*, **77**:189-201.
- DEREURE, J.; REYNES, J.; PRATLONG, F.; MARTINI, A.; LEFEBRE, M.; RIOUX, J. A.; JAMBOU, F. & DEDET, J. P. (1994). "Leishmaniosis visceral en pacientes infectados por el VIH en el Sur de Francia. Datos parasitológicos y epidemiológicos". *X Reunión Anual de la APE*. Sitges, 1994, p. 8.
- EL HASSAN, A. M.; ZILJSTRA, E. E.; MEREDITH, S. E. D.; GHALIB, H. W. & ISMAIL, A. (1993). "Identification of *Leishmania donovani* using PCR in patient and animal material obtained from an area of endemic kala-azar in the Indian". *Acta Tropica*, **55**:87-90.
- EL-HARITH, A.; KINGU, S. & LEARMAN, J. J. (1986). "A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis". *Trans. R. Socv. Trop. Med. Hyg.*, **80**:583-87.
- EVANS, D. & Edit. (1989). "Handbook on isolation, characterization and Cryopreservation of *Leishmania*". *T. D. R/O. M. S.*, Geneva, 45 pp.
- FISA, B.; PORTUS, M.; GALLEGO, M.; VALL, D. & AISA, M. J. (1992). "Diagnóstico serológico de la leishmaniosis en la comarca del Priorato (Tarragona)". *Clin. Vet. pequeños animales*, **12**:231-36.
- GALLEGO, J.; BOTET, J.; GALLEGO, M. & PORTUS, M. (1992). "Los flebotomos en la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura". En: In Memoriam Prof. F. Martínez Gómez. Edit. S. Hernández, Univ. Córdoba, pp. 577-600.
- GIL COLLADO, J.; MORILLAS MÁRQUEZ, F. & SANCHÍS MARÍN, C. (1989). "Los flebotomos en España". *Rev. San. Hig. Publ.*, **68**:15-34.
- GÓMEZ NIETO, C.; HABELA, M. A.; NAVARRETE, I.; MOLINA, C.; JIMÉNEZ, A. & SERRERA, J. L. (1992). "Changes in the plasma concentration of lipids and lipoproteins fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*". *Vet. Parasit.*, **44**:175-82.
- GÓMEZ NIETO, C.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. & HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S. (1992). "Seroprevalence of canine leishmaniasis around Caceres Spain". *Prev. Vet. Med.*, **13**:173-78.
- GRAMICCIA, M.; MAAZOUN, R.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; LE BLANCQ, S. M.; EVANS, D. A.; PETERS, W.; BETTINI, S.; GRADONI, L. & POZIO, E. (1982). "Typage enzymatique de onze souches de *Leishmania* isolées, en Italie Continentale, á partir de formes viscerales murines, canines et vulpines. Mise en evidence d'un variant enzymatique chez le renard (*Vulpes vulpes*) et le chien". *Ann. Paras. Hum. Comp.*, **57**:527-31.
- GRAMICCIA, M.; SMITH, D. F.; ANGELICI, M. C.; READY, P. D. & GRADONI, L. (1992). "A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*". *Parasitol.*, **105**:29-34.
- GRANER, C.; ELINDER, G.; OST, A. & HEUTER, J. I. (1983). "Kala-azar in one year old Swedish chill. Diagnostic difculties because of active hemophagocytosis". *Acta Pediatr.*, **82**:794-6.
- GRAUERT, C.; ELINDER, G.; OST, A. & HEUTER, J. I. (1993). "Kala-azar in one year old Swedish child. Diagnostic difculties because of active hemophagocytosis". *Acta Pediatr.*, **82**:794-6.
- HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S.; GÓMEZ NIETO, C.; MARTÍNEZ, M. & DE LA HIGUERA, J. M. (1987). "Aspectos clínicos de la leishmaniosis canina". *Rev. Iber. Parasitol.*, vo. extr. pp. 61-66.

- HEUDIER, P.; TAILLARS, B.; GAMIER, G.; MARTY, P.; FURIBET, J. G. & DUJARDIN, P. (1993). "Localisation pulmonaire d'une leishmaniose viscerale au cours de l'infection par le VIH". *Pres. Medic.*, **22**:1060.
- HOERAUF, A.; ANDRADE, P. P.; ANDRADE, C. R.; SOLVACH, W. & ROLLINGHOFF, M. (1992). "Immunoblotting as a valuable tool to differentiate human visceral leishmanioses from lymphoproliferative disorders and other clinically similar diseases". *Res. Immunol.*, **143**:375-83.
- IZRI, M. A.; ROBINEAN, M.; PETITHORY, I. C. & ROUSSET, J. J. (1992). "Leishmaniose viscerale. Diagnostic parasitologique par leucoconcentration". *Pres. Med.*, **22**:1010.
- JIMÉNEZ, M. I.; GUTIÉRREZ SOLAR, B.; BENITO, A.; AGUIAR, A.; GARCÍA, E.; CERCENEDO, E. & ALVAR, J. (1991). "Cutaneous *Leishmania infantum* zymodemes isolates from bone marrow in AIDS patients". *Res. Rev. Parasitol.*, **51**:95-99.
- JOKIPH, L.; SALMELA, K.; SAHA, M.; KYRONSEPPA, H.; EKLUND, B.; EVANS, D.; WILLERBRAND, E. & JOKIPH, A. M. (1992). "Leishmaniasis diagnosed from Bronchoalveolar lavage". *Scan. J. infect. Dis.*, **24**:677-81.
- KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. M.; RIOUX, J. A. & LEANEY, A. J. (1980). "Possible origins of *Leishmania chagasi*". *Am. Trop. Med. Hyg.*, **74**:563-65.
- LAINSON, R. & SHAW, J. J. (1979). "The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis". In: *Biology of Kinetoplastida*. Edit. Lumsden and Evans. Academic Press., New York, pp. 1-116.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T. & BRAGA, R. R. (1987). "American leishmaniasis: on the origin of leishmania (*Leishmania chagasi*)". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**:517.
- LEGER, N.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; MADULO LEBLOND, G.; PESSON, B.; FETE, H.; BOULANGER, N.; KILLICK-KENDRICK, R. & KILLICK-KENDRICK, M. (1983). "Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **85**:217-19.
- LONGSTAFFE, J. A. & GUY, M. W. (1985). "Leishmaniasis in dogs". *Vet. Ann.*, **25**:358-67.
- LUCIENTES, J.; SÁNCHEZ ACEDO, C.; CASTILLO, J. A. & ESTRADA, A. (1988). "Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* en el foco de leishmaniosis de Zaragoza". *Rev. Iber. Parasitol.*, **48**:7-8.
- MA, D. D. F.; COURANNOU, A. J. & HAYES, J. (1979). "Fatal leishmaniasis in renal transplant recipient". *Lancet*, 1979ii, 312-13.
- MARÍN INIESTA, F.; MARÍN INIESTA, E. & MARTÍN LUENGO, F. (1982). "Papel de perros y zorros como reservorios de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares". *Rev. Iber. Parasitol.*, **42**:307-13.
- MARTÍN SÁNCHEZ, J.; GUILVARD, E.; ACEDO SÁNCHEZ, C.; WOLF ECHEVERRI, M.; SANCHÍS MARÍN, M. C. & MORILLAS MÁRQUEZ, F. (1994a). "*Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (Southern Spain)". *Inter. J. Parasit.*, **24**:405-408.
- MARTÍN SÁNCHEZ, J.; MORILLAS MÁRQUEZ, F.; SANCHÍS MARÍN, M. C. & ACEDO SÁNCHEZ, C. (1994b). "Isoenzymatic characterization of the etiologic agent of canine leishmaniasis in the Granada region of Southern Spain". *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, **50**:758-62.
- MARTÍN SÁNCHEZ, J.; MORILLAS MÁRQUEZ, F.; ACEDO SÁNCHEZ, C. & SANCHÍS MARÍN, C. (1994c). "The variability of the etiological agent of leishmaniasis in the North-east of the Almería region, South-east Spain". *Syst. Parasit.* (aceptado).
- MARTÍNEZ CRUZ, S.; MARTÍNEZ MORENO, A.; MARTÍNEZ MORENO, F. J.; MARTÍNEZ GÓMEZ, F. & HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S. (1990). "Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba". *Rev. Iber. Parasitol.*, **50**:1-7.

- MARTÍNEZ CRUZ, S.; MARTÍNEZ MORENO, T.; GUTIERREZ MONTAÑÉS, P. & MARTÍNEZ MORENO, F. J. (1992). "Alteraciones de las proteínas séricas en la leishmaniosis visceral canina". En: In Memoriam Prof. F. Martínez Gómez. Edit. S. Hernández. Univ. Córdoba, pp. 149-56.
- MARTÍNEZ GÓMEZ, F.; HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S.; NAVARRETE, I.; ACOSTA, I. & MORENO, T. (1982). "La leishmaniosis canina en el Sur de España". *I Simp. Nac. Razas caninas*. Córdoba, 1982, pp. 43-48.
- MARTÍNEZ MORENO, A.; ACOSTA GARCÍA, I.; BECERRA MONTELLO, C. & HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S. (1992). "Estudio clínico-analítico de la leishmaniosis canina experimental". En: In Memoriam Prof. F. Martínez Gómez. Edit. S. Hernández, Univ. Córdoba, pp. 157-80.
- MARTÍNEZ ORTEGA, E. & CONESA GALLEGO, E. (1987). "Fenología de los Flebotomos del subgénero *Larrousius* (Dipt. Psychodidae, Phlebotomus) en el Sureste de la península Ibérica". *Bol. Asoc. Entom.*, 11:293-300.
- MARTÍNEZ ORTEGA, E.; ROMERA, H.; CONESA-GALLEGO, E. & GOYENA, M. (1991). "Estudio comparado de la antropofilia y el fototropismo de los flebotomos en un foco de leishmaniosis del Sureste de la península Ibérica". *Parassitología*, 33 (suppl.):413-19.
- MARTÍNEZ, P.; VEGA, E.; LAGUNA, F.; SORIANO, V.; PUENTES, S.; MORENO, V.; SENTCHORDI, M. J.; GARCÍA AGUADO, C. & GONZÁLEZ LA-HOZ, J. (1993). "Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV+ infected individuals using peripheral blood smears". *AIDS*, 7:227-30.
- MARTINO, L.; RAIMONDI, F.; SCOTTI, S.; DAVIDSON, R. N.; GRADONI, L. & GIACHINO, R. (1993). "Efficacy and tolerability of liposomal amphotericin B in italians infants with visceral leishmaniasis". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87:477.
- MARY, C.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. & QUILICI, M. (1992). "Westernblot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 47:764-71.
- MEDRANO, F. J.; HERNÁNDEZ QUERO, J.; JIMÉNEZ, E.; PINEDA, J. A.; RIVERO, A.; SÁNCHEZ QUIJANO, A.; VICIANA, P.; CASTILLO, R.; REYES, M.; CARVAJAL, F.; LEAL, M. & LISSEU, E. (1992). "Visceral leishmaniasis in HIV-1 infected individuals: a common opportunistic infection in Spain?". *AIDS*, 6:1497-1503.
- MEGISTU, G.; AKUFFO, H.; FEHNIGER, T. E.; NEGESE, Y. & NILSEN, R. (1992). "Comparison of parasitological and immunological method sin the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86:154-7
- MOLINA, R.; LÓPEZ VÉLEZ, R.; GUTIÉRREZ SALAR, B.; JIMÉNEZ, M. I. & ALVAR, J. (1992). "Isolation of *Leishmania infantum* from the blood of a patient with AIDS using sandflies". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86:516.
- MOLYNEUX, D. M. & ASHFORD, R. W. (1985). "The Biology of Trypanosome and Leishmania, parasites of man and domestic animals". Edit. Taylor and Francis, 1983, London, 294 pp.
- MORENO, G.; RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F. & SERRES, E. (1986). "Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numerique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corolaires biogeographiques et phyletiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde". In: *Leishmania Taxonomie et phylogenese. Applications eco-epidemiologiques*. Edit. J. A. Rioux. I. M. E. E. Montpellier, pp. 105-117.
- MORILLAS MÁRQUEZ, F.; BENAVIDES DELGADO, I.; GONZÁLEZ CASTRO, J.; REYES MAGAÑA, A. & VALERO LÓPEZ, A. (1985). "Decouverte *Leishmania* s. p. dans des *Rattus rattus* de la province de Grenade (Espagne)". *Ann. Paras. Hum. Comp.*, 60:768-70.
- MORILLAS MÁRQUEZ, F.; GUEVARA BENÍTEZ, D. C.; ÚBEDA ONTIVEROS, J. M. &

- GONZÁLEZ CASTRO, J. (1983). "Fluctuations annuelles des populations des Phlébotomes dans la province de Grenada (Espagne)". *Ann. Paras. Hum. Comp.*, **58**:625-32.
- MORILLAS MÁRQUEZ, F.; SANCHÍS MARÍN, C.; ACEDO SÁNCHEZ, C.; MORILLAS MÁRQUEZ, A. & MARTÍN SÁNCHEZ, J. (1992). "Encuesta sero-epidemiológica sobre la leishmaniosis canina e infección del flebotomo vector por *Leishmania*, en la provincia de Almería (Sur de España)". En: In Memoriam Prof. F. Martínez, Gómez. Ed. S. Hernández, Univ. Córdoba, pp. 135-47.
- O. M. S. (1984). "Las leishmaniosis". Ser. Inf. Técnicos, n.º 701. Ginebra, 153 pp.
- (1990). "Lucha contra la leishmaniosis". Ser. Inf. Técnicos. n.º 709, Ginebra, 177 pp.
- OLLIARO, P. C. & BRYCESON, A. D. M. (1993). "Practical progres and new drugs for changing patterns of leishmaniasis". *Parasit. Today*, **9**:323-28.
- PETROVIC, Z.; BORDJOSKEI, A. & SAVIN, Z. (1978). "Les résultats de recherches sur le reservoir de *Leishmania donovani* dans un region endémique du Kala-azar". Proc. 2nd. Europ. Multicoll. Parasit., Trogir, pp. 97-98.
- PIRES, C. A. (1984). "Les Phlebotomes du Portugal. 1. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* por *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrabida (Portugal)". *Ann. Paras. Hum. Comp.*, **54**:521-24.
- PORTUS, M. (1987). "Diagnóstico de laboratorio de las leishmaniosis autóctonas". *Lab. 2000*, **12**:21-28.
- PORTUS, M.; RIOUX, J. A.; GALLEGO, J.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F. & MORENO, G. (1986). "Les leishmanioses en Catalogne (Espagne)". A propos de l'identification enzymatique de neuf souches d'origine humaine et canine. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogenese. Coll. Intern. CNRS/INSERM. Montpellier*, 1986, pp. 433-38.
- POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S. & GRAMICCIA, M. (1981). "Leishmaniasis in Tuscany (Italy). V. Further isolation of leishmania from *Rattus rattus* in the Province of Grosseto". *Ann. trop. Med. Parasit.*, **75**:393-95.
- REPISO, R.; ORTEGA, L.; LÓPEZ MORALES, J.; PEIS, J. & MORENO MARTÍN, J. (1977). "Kala-azar. Presentación de siete nuevos casos". *Arch. Ped.*, **28**:221-230.
- REYES MAGAÑA, A.; MORILLAS MÁRQUEZ, F.; MONTES RAMÍREZ, E.; SANCHÍS MARÍN, M. C.; BENAVIDES DELGADO, I. & GONZÁLEZ CASTRO, J. (1989). "La leishmaniosis en la provincia de Granada: estudio de la enzootia canina". *Ars. Pharmaceutica*, **30**:35-44.
- RIOUX, J. A. (Ed.) (1986). "Leishmania. Taxonomie et phylogenese. Applications Eco-epidemiologiques". Cll. Int. CNRS, I. M. E. E., Montpellier, 537 pp.
- RIOUX, J. A.; ALBARET, J. L.; HOUIN, R.; DEDET, J. P. & LANOTTE, G. (1968). "Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 2. Les reservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes*)". *Ann. Paras. Hum. Comp.*, **43**:421-28.
- RIOUX, J. A. & GOLVAN, Y. J. (1969). "Epidemiologie des leishmanioses dans le Sud de la France". Monogr. INSERM. n.º 37, Paris, 223 pp.
- RIOUX, J. A.; GOUBERT, J. R.; LANOTTE, G.; ROUSTAN, J. & MORO, A. (1980). "Un cas de leishmaniose autoctone de la muqueuse nasale". *Cah. O. R. L.*, **15**:423-25.
- RIOUX, J. A.; GUILVARD, E.; GALLEGO, J.; MORENO, G.; PRATLONG, F.; PORTUS, M.; RISPAIL, P.; GALLEGO, M. & BASTIEN, P. (1986). "*Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* vecteurs du complex *Leishmania infantum* dans un même foyer. Infestation par deux zymodemes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne. (Espagne)". En: *Leishmania. Taxonomie et Phylogenese. Edit. Rioux, J. A.; IMEE. Montpellier*, pp. 439-444.
- RIOUX, J. A.; JARRY, D. M.; LANOTTE, G.; MAAZOUN, R. & KILLICK-KENDRICK, R. (1984). "Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 18. Identification enzymatique

- de *Leishmania infantum* isolé de *Phlebotomus ariasi* spontanément infesté en Cevennes". *Ann. Paras. Hum. Comp.*, **59**:331-3.
- RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; CROSET, H.; HOUIN, R.; GUY, Y. & DEDET, J. P. (1974). "Ecologie des leishmanioses dans le Sud de France. 3. Réceptivité comparée de *Phlebotomus ariasi* et *Rhipicephalus turanicus* vis-à-vis de *Leishmania donovani*". *Ann. Paras. Hum. Comp.*, **47**:147-57.
- ROLLAND, L.; MONJOUR, L.; DAVIS, M. & GENTILINI, M. (1992) "Leishmaniose viscerale. Diagnostic par immuno-empreinte". *Pres. Med.*, **21**:971-73.
- SÁNCHEZ REINA, A.; PALOMO SANZ, V. & LÓPEZ MADROÑERO, C. (1985). "La leishmaniosis cutánea: un problema sanitario endémico en Almachar (Malaga)". Primer Congreso Nacional de Médicos Titulares. M.º Sanidad y Consumo, pp. 607-17.
- SÁNCHEZ VIZCAÍNO, J.; HARO GAVALDÓN, V.; MARTÍN SÁNCHEZ, J. & DELGADO FRANCISCO, V. (1993). "Leishmaniosis cutánea crónica lupoide". *Actas Dermo-sif.*, **84**:165-67.
- SANCHÍS MARÍN, C.; VILLEGAS, G. & MORILLAS MÁRQUEZ, F. (1986). "Flebotomos y leishmaniosis en la provincias de Almería". *Rev. San. Hig. Publ.*, **60**:1131-39.
- SANCHÍS MARÍN, M. C.; MORILLAS MÁRQUEZ, F.; GONZÁLEZ CASTRO, J. & BENAVIDES DELGADO, I. (1986). "Dinámica estacional de los flebotomos de la provincia de Almería". *Rev. Iber. Parasitol.*, **46**:285-91.
- SCAGLIA, M.; VILLA, M.; GATTI, S. & FABIO, F. (1989). "Cutaneous leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **83**:338-39.
- SCOTT, J. M.; SHREFFLER, W. G.; GHALIB, H. W.; ASAD, A. E.; SIDDIG, M.; BADARO, R. & REED, S. G. (1991). "A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **44**:272-77.
- SCHREY, C. F.; PIRES, C. A. & MACVEAN, D. W. (1989). "Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal". *Med. Vet. Ent.*, **3**:125-130.
- SEGOVIA, M. & MARTÍN LUENGO, F. (1985). "Leishmaniasis in the South east of Spain: preliminary results of a serological and parasitological study in dogs". *Ann. Trop. Med. Para.*, **79**:337-38.
- SINGLA, N.; SINGH, G. S.; SUNDAR, S. & VINAYAK, V. K. (1993). "Evaluation of the direct agglutination test as an immunodiagnostic tool for kala-azar in India". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**:276-78.
- SMYTH, A. J.; GHOSH, A.; HOSSAM, M. A.; BASU, D.; DE BRUIJN, M. M.; ADHGA, S.; MALLIK, K. K. & BARKER, D. C. (1992). "Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients". *Parasitol.*, **105**:183-92.
- TESOURO DÍEZ, M. A.; RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, M. & CHACHIO, S. B. (1983). "Leishmaniosis canina en el área de Madrid". 9.º Congreso Nac. Microbiol. Valladolid, 1983, t. 1 (2):831-32.
- TESOURO, M. A.; RODRÍGUEZ, F.; SÁINZ, A. & JIMÉNEZ, (1992). "Contribuciones al diagnóstico y patocromía de la leishmaniosis canina I y II". *Informacion Veterinaria*, **125**:40-46; **127**:34-40.
- TORREGROSA, J.; RICART, M. J.; MONTESINO, M.; CAMPISTOL, J. M.; MORENO, A.; CLARAMONTE, X.; ANDREU, J. & CARRETERO, P. (1993). "Visceral leishmaniasis like cause of unexplained fever in a reno-pancreaticgraft recipient". *Nephron*, **65**:318-17.
- VOULDOUKIS, I.; MONJOUR, L.; FROMMEL, D.; ROSENHEIM, M.; DATRY, A.; COLOMBVALLET, I. & GENTILLINI, M. (1987). "Prélèvement par aspiration à l'aiguille dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée". *Pres. Med.*, **16**:76-77.

- YEBRA, M.; SEGOVIA, J.; MANZANO, L.; VARGAS, J. A.; BERNALDO DE QUIRÓS, L. & ALVAR, J. (1988). "Disseminated to skin kala-azar and acquired Immunodeficiency Syndrome". *Am. Intern. Med.*, **108**; 490-91.
- ZUCKERMAN, A. & LAISON, R. (1977). "Leishmania". In: *Parasitic Protozoa*. Edit. by Kreier. Academic Press, London. Vol. 1, pp. 58-133.