



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Optimización del diagnóstico parasitológico
de la leishmaniosis tegumentaria y
caracterización de especie/s de *Leishmania*
causantes del cuadro clínico en Cochabamba
(Bolivia)**

Mary Cruz Torrico de Solano



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Tesis doctoral

**“OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LA
LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA Y CARACTERIZACIÓN DE
ESPECIE/S DE *LEISHMANIA* CAUSANTES DEL CUADRO CLÍNICO
EN COCHABAMBA (BOLIVIA)”**

Autor/a: Mary Cruz Torrico de Solano

Directores: Dra. Montserrat Gállego Culleré

Dr. Faustino Torrico

**Programa de Doctorat: Doctorado en Investigación, Desarrollo y
Control de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Ciencias de la
Alimentación**

(septiembre, 2023)



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**“OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE
LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA Y CARACTERIZACIÓN
DE ESPECIE/S DE *LEISHMANIA* CAUSANTES DEL CUADRO
CLÍNICO EN COCHABAMBA (BOLIVIA)”**

Autora: Mary Cruz Torrico de Solano

Directores: Dra. Montserrat Gállego Culleré

Dr. Faustino Torrico

**Programa de Doctorat: Doctorado en Investigación, Desarrollo y
Control de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Ciencias de la
Alimentación**

(septiembre, 2023)



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**“OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LA
LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA Y CARACTERIZACIÓN DE
ESPECIE/S DE *LEISHMANIA* CAUSANTES DEL CUADRO CLÍNICO EN
COCHABAMBA (BOLIVIA)”**

Memoria presentada por Mary Cruz Torrico de Solano para optar al
grado de Doctor por la Universitat de Barcelona.

Directores:

Dra. Montserrat Gállego Culleré

Dr. Faustino Torrico

Doctoranda:

Mary Cruz Torrico de Solano

Septiembre, 2023

Montserrat Gállego Culleré, Doctora en Farmacia y Profesora Titular de la Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Universitat de Barcelona, y Faustino Torrico, Doctor en Ciencias Médicas, Profesor titular de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Simón.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Optimización del diagnóstico parasitológico de la leishmaniosis tegumentaria y caracterización de especie/s de *Leishmania* causantes del cuadro clínico en Cochabamba (Bolivia)”, presentado por la licenciada en Bioquímica y Farmacia, Mary Cruz Torrico de Solano, ha sido realizado en Bolivia en los laboratorios de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Simón y de Biología Molecular de la Fundación CEADES y Medio Ambiente y en España, en la Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Universitat de Barcelona y en el Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau bajo las direcciones en ambos países y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral con Mención Internacional.

Barcelona, 26 de septiembre de 2023.

Directores de la Tesis Doctoral:



Dra. Monserrat Gállego Culleré



Dr. Faustino Torrico

*A mis hijas y mi esposo, que son lo más importante de mi vida,
que siempre estuvieron junto a mí en los momentos más críticos
y a toda mi familia, que me apoyaron moralmente en todo momento.
A las personas, que contrajeron la enfermedad por la necesidad de
buscar mejores condiciones de vida, quienes han permitido realizar
esta investigación, a fin de prevenir y controlar esta
enfermedad destendida en Bolivia.*

My savings are almost gone. I haven't driven the taxi for many weeks now. I can't. It is very painful to push the brake pedal with this wounds on my foot. I thought it was a simple skin disease at first, but I now realise it's a specific disease, which needs specialised treatment. I hope I can quickly go back to work and earn money again."

Saeepur, Pakistan – affected by CL

Mis ahorros casi se han ido. No he conducido el taxi durante muchas semanas. No puedo. Es muy doloroso pisar el pedal del freno con esta herida en mi pie. Pensé que era un simple enfermedad de la piel al principio, pero ahora me doy cuenta de que es una enfermedad específica, que necesita un tratamiento especializado. Espero poder volver rápidamente a trabajar y ganar dinero otra vez."

Saeepur, Pakistán – afectado por LC

Overcoming Neglect. Finding ways to manage and control Neglected Tropical Diseases.
Médecins Sans Frontières (MSF), 2015

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a las personas que me han ayudado a cumplir el reto de concluir la tesis, que sin vuestra ayuda no hubiera sido posible:

A mis directores de tesis, la Dra. Montserrat Gállego, Profesora Titular de la Sección de Parasitología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona, quien me ha impulsado a continuar mi formación profesional, por su apoyo constante e incondicional en el desarrollo de la tesis doctoral que hoy llega a la conclusión y sobre todo en lo personal por acogerme en su familia en los periodos de estancia en Barcelona. Al Dr. Faustino Torrico, profesor titular de Parasitología de la Carrera de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, por sus sabias enseñanzas que dieron origen a mi apasionante interés por la Parasitología clínica y continuar mi formación académica de pos grado e iniciar mi carrera como investigadora en el área de parasitología. Gracias a ambos por la confianza depositada en mí y por tiempo dedicado para que la tesis fuera concluida.

Al Dr. Albert Picado, quien financió parte del proyecto, concretamente la estancia de Cristina Ballart para colaborar en trabajo de laboratorio y captación de pacientes, envío de muestras, etc.

A la Dra. Carme Muñoz, Jefe de la Sección de Parasitología del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo y Profesora Titular del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad, por sus sabios consejos y acogerme en el laboratorio de del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, donde se ha realizado el estudio molecular y proteómico del proyecto de tesis bajo la dirección de Anna Fernández y en lo personal por su calidad y hospitalidad.

Al Dr. Joaquim Gascón, jefe del Servicio de Salud Internacional del Hospital Clínic y Director de la Iniciativa Chagas del Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), por sus comentarios sus aportes a las publicaciones.

Al equipo de Parasitología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universitat de Barcelona y en especial a la Dra. Cristina Ballart, con quien tuvimos la oportunidad de trabajar juntas en Bolivia en la atención de los pacientes que fueron víctimas de esta enfermedad olvidada; a Anna Fernández-Arévalo por su invaluable enseñanza en herramientas de tipificación de cepas de Leishmania por Biología molecular y por espectroscopia de masas, así como por sus consejos; a Alba Abras, por sus sabios consejos en la interpretación de los resultados del diagnóstico parasitológico; a Silvia Tebar por su gran apoyo en el cultivo de parásitos y a Albert Arnau por sus discusiones en la parte molecular. Gracias querido equipo, por acogerme y darme el apoyo necesario en cada una de las etapas del desarrollo de este proyecto de tesis; durante la estancia en Barcelona, así como a distancia en Bolivia. Gracias por vuestro tiempo, que pese a las diferencias de horario ustedes siempre estuvieron dispuestas a apoyarme en los momentos más críticos que tuve.

Al Dr. Pere Coll por su acogida en el Hospital de Sant Pau y a la Dra. Teresa Llovet por sus aportes en la caracterización de las leishmanias y revisión de los manuscritos.

En el equipo del Laboratorio Parasitología de LABIMED, de la Facultad de Bolivia, Dr. Hernán Bermúdez director de los laboratorios en el inicio del proyecto de tesis, que en paz descanse, quien gestionó la salida en comisión para las primeras estancias en Barcelona. Dr. Ernesto Rojas director del Centro Universitario de Medicina Tropical (CUMETROP), quien apoyó en el reclutamiento de los pacientes y realizó el diagnóstico clínico epidemiológico de los pacientes que formaron parte del estudio. Dr. Daniel Illanes Velarde, director del Instituto de investigaciones y

actual Decano de la Facultad de Medicina-UMSS, de quien dio el Aval institucional para el desarrollo de la tesis y facilito las declaratorias en comisión para las estancias en Barcelona. Fabiola Gonzales Agreda, por su apoyo técnico en el diagnóstico parasitológico y por estar siempre conmigo como amiga y confidente en lo personal y profesional. A Marcela Luizaga directora del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina por su apoyo en investigación, sus consejos como profesional y como amiga y a Yercin Mamani investigador de la Facultad de Medicina, por su apoyo en el análisis estadístico y sus aportes.

Fundación CEADES y medio Ambiente, por el financiamiento para la ejecución del proyecto de tesis desarrollado en Bolivia. Dr. Faustino Torrico, presidente de la fundación quien el aval institucional para realizar la tesis, por la confianza depositada en mí. Dr. Daniel Lozano que gestionó la logística para la ejecución del proyecto de tesis, por apoyo técnico y sus consejos como amigo. Lilian Pinto, por su apoyo técnico en biología molecular. Lic. Felix Condori por el apoyo administrativo, así como también al personal del laboratorio, Goreti, Karen y Mery.

Mi familia, a quienes quiero mucho, por el apoyo moral recibido y comprensión. A mis papás y mi hermanito, que en paz descansan, que desde donde estén, sé que estarán muy felices por mi logro que siempre creyeron en mí. A mi hermana Silvia que siempre está pendiente de mí, y que, gracias a sus decisiones, valentía y consejos, hizo posible obtener todos mis logros conseguidos en lo personal y profesional, así como el apoyo moral de mis queridas hermanitas Lourdes, Betty y Fenny, mis cuñados y cuñadas y mis sobrinas y sobrinos. A mis cuatro tesoros, mis hijitas, Ana Valeria, Mariana, Adriana Anahí y Vianca Avril, gracias queridas hijas por haberme permitido cumplir este reto, robándoles el tiempo destinado para compartir con ustedes, pero servirá para demostrarles que “todo es posible en la vida si uno quiere”, que no existe la frase no puedo, “querer es poder”, gracias por haber estado conmigo en los momentos más difíciles de

desesperación. Mi amado esposo Marco, que siempre estuviste conmigo en las buenas y en las malas, apoyándome en el cuidado de nuestras hijitas, y por estar ayudándome en lo profesional y en lo personal. Gracias a Dios por darme una maravillosa familia.

Los pacientes que padecen de esta terrible enfermedad, que migraron en busca de tener la oportunidad de mejorar sus condiciones de vida de sus familias, solo consiguieron ser víctimas de estos parásitos. Estas personas desesperadas de ver sufrir a sus hijos, esposas y ellos mismos, tuvieron que recorrer largas distancias, para llegar a la ciudad a buscar atención médica. Desde varios años atrás hemos trabajado tratando de mejorar el diagnóstico de la leishmaniosis tegumentaria, así surge el proyecto de tesis de tesis, donde esta población afectada acepta formar parte del estudio y que, gracias a su valiosa participación logramos tener resultados, que contribuirán a conocer el comportamiento de la enfermedad, tener un diagnóstico rápido y oportuno y la atención médica correspondientes, sin tener que recorrer largas distancias, a pedir ayuda.

¡Gracias a todos, desde lo más profundo de mi ser!

“No juzgues a las personas hasta que no seas capaz de meterte en su piel. Dédicales un poco de atención.”

Guy Kawasaki

ÍNDICE GENERAL

PÁG.

RESUMEN/ABSTRACT/RÉSUMÉ	1
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 LAS LEISHMANIOSIS COMO ENFERMEDADES DESATENDIDAS	9
1.1.1 FORMAS CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIOSIS	10
1.1.2 CICLO BIOLÓGICO DE LAS LEISHMANIAS Y TIPOS DE CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LAS LEISHMANIOSIS	12
1.1.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS LEISHMANIOSIS	16
1.2 EL AGENTE ETIOLÓGICO: LAS LEISHMANIAS.....	22
1.2.1 TAXONOMÍA	24
1.2.2 COMPLEJOS Y ESPECIES DE <i>LEISHMANIA</i> EN LAS AMÉRICAS	27
1.3 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS LEISHMANIOSIS.....	34
1.3.1 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	34
1.3.2 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	36
1.3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	36
1.3.4 DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO.....	37
1.4 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>LEISHMANIA</i>	38
1.4.1 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS BIOQUÍMICAS: ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS (MLEE)	38
1.4.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	39
1.4.3 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS PROTEÓMICAS: ESPECTROSCOMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	48
1.5 CONTROL Y TRATAMIENTO DE LAS LEISHMANIOSIS.....	49
1.5.1 FALLA TERAPÉUTICA Y RESISTENCIA.....	53
1.6 LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA	54
1.6.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA LEISHMANIOSIS EN BOLIVIA	54
1.6.2 ESPECIES DE <i>LEISHMANIA</i> QUE CAUSAN LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA.....	56
1.6.3 FORMAS CLÍNICAS DE LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA	57
1.6.4 CICLO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA	59
1.6.5 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA	63
1.6.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS LEISHMANIAS EN BOLIVIA	65
1.6.7 TRATAMIENTO Y FALLA TERAPÉUTICA	66
1.6.8 VIGILANCIA Y CONTROL	68

II. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	70
II.1 HIPÓTESIS-----	70
II. 2 OBJETIVOS/OBJETIVES/ OBJECTIFS -----	70
II.3 PLAN DE TRABAJO-----	72
II.3.1 CENTROS DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO-----	72
II.3.2 ETAPAS DE DESARROLLO DEL PROYECTO-----	73
II.3.3 METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ESTUDIO-----	73
III. RESULTADOS	75
CAPÍTULO 1 -----	76
“Tegumentary leishmaniosis by <i>Leishmania braziliensis</i> complex in Cochabamba, Bolivia including the presence of <i>L. braziliensis</i> outlier” -----	76
CAPÍTULO 2 -----	92
“Usefulness of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in the Characterization of Leishmania Strains Causing Tegumentary Leishmaniosis in Bolivia versus hsp70 Gene Sequencing”-----	92
CAPÍTULO 3 -----	104
“‘The need for culture in tegumentary leishmaniasis diagnosis in Bolivia: a comparative evaluation of four parasitological techniques using two sampling methods.’-----	104
IV. DISCUSIÓN	136
V. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS/CONCLUSIONS	144
VI. BIBLIOGRAFÍA	154

Lista de abreviaturas y siglas

ADNk	Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados)
AmB-D	Desoxicolato de anfotericina B
AmB-L	Anfotericina B liposomal
AVAD	Años perdidos ajustados por discapacidad
Bst	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
COII	Subunidad II de la Citocromo-Oxidasa
cpB	<i>Cysteine protease B</i>
cyt b	Gen <i>Citocromo b</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EPD	Examen parasitológico directo
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FFLB	Fluorescent fragment length análisis Barcoding (Análisis de longitud de fragmentos fluorescentes Código de barras.)
FT	Falla terapéutica
G6PD	Enzima <i>glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</i>
GP63	Glucoproteína <i>GP63</i>
HaeIII	Enzima de restricción <i>Haemophilus aegyptius</i>
Hd	Haplotype diversity (Diversidad de haplotipos)
HRM	High resolution melting (Curvas de fusión de alta resolución)

<i>hsp70</i>	Heat shock protein 70 (proteína de choque térmico 70)
ICD	Enzima <i>isocitrato deshidrogenasa</i>
ICTLC	Índice Compuesto de transmisión de Leishmaniosis cutánea
IDRM	Intradermoreacción de Montenegro
ITS1	Espaciador transcrito interno 1 (Internal transcribed spacer)
kDa	Kilo Dalton
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LC	Leishmaniosis cutánea
LCD	Leishmaniosis cutáneo difusa o diseminada
LCL	Leishmaniosis cutáneas localizadas
LM	Leishmaniosis mucosa
LMC	Leishmaniosis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniosis tegumentaria
LTA	Leishmaniosis tegumentaria americana
LV	Leishmaniosis visceral
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo
MDH	Enzima <i>Malato deshidrogenasa</i>
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis (Electroforesis de Enzimas Multilocus)
MLMT	Multilocus microsatellite typing (Tipificación de Microsatélites Multilocus)
MLST	Multilocus Sequence Typing (Tipificación de Secuencias Multilocus)
MPI	Enzima <i>Manosa-6- fosfato isomerasa</i>

MS	Mass spectrometry (espectrometría de masas)
MSL	Mass spectra library (Liberia de espectroscopia de masas)
IDRM	Intradermoreacción de Montenegro
mtADN	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
n-ADN	Ácido desoxirribonucleico nuclear
NASBA	Nucleic acid sequence-based amplification (Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos)
NNN	Medio de cultivo Novy, Nicolle y McNeal
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud/World Health Organization
OPS/PAHO	Organización Panamericana de la Salud/Pan American Health Organization
PCR-RFLP	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase chaine reaction) - Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Restriction fragment length polymorphis)
PCR-HRM	Polimerase Chain Reaction - High Resolution Melting (A nálisis de alta resolución de fusion)
6PGDH	Enzima <i>glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)</i>
qPCR	Quantitative or real-time PCR (PCR cuantitativa o a tiempo real)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Amplificación al Azar de ADN Polimórfico)
rK39-TDR	Antígeno Recombinante K39-técnica rápida de diagnóstico
APR	Amplificación de polimerasa recombinasa
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
rRNA 18S	RNA ribosomal 18S
SbV	Antimonio pentavalente

SbIII	Antimonio trivalente
SSG	Sodium stibogluconate (Estibo gluconato de sodio)
SSU rRNA	Small subunit ribosomal ribonucleic acid (pequeña sub unidad de ácido ribonucleico)
VIH-SIDA	Virus de Inmunodeficiencia humana- síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
Figura 1. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	13
Figura 2. Tipos de ciclos epidemiológicos de las leishmaniosis	15
Figura 3. Distribución geográfica de la leishmaniosis.....	18
Figura 4. Número de casos (A) e incidencia por 100.000 habitantes (B) de la LC en la Región de las Américas, 2021	22
Figura 5. Características morfológicas de <i>Leishmania</i> spp	23
Figura 6. Clasificación taxonómica de las especies de <i>Leishmania</i>	26
Figura 7. Distribución del número de especies de <i>Leishmania</i> consideradas patógenas para el ser humano.....	27
Figura 8. Cuadros clínicos de leishmaniosis tegumentaria en las Américas y especies responsables	30
Figura 9. Toma de muestras para el diagnóstico de las leishmaniosis en las Américas	35
Figura 10. Descripción del fundamento de la técnica de la espectrometría de masas MALDI-TOF.....	48
Figura 11. A) Departamentos de Bolivia con LT presente, B) Situación epidemiológica de la LC y LM en Bolivia en 2021	55
Figura 12. Tipos de lesiones cutáneas de la leishmaniosis en Bolivia con sus respectivas características gráficas	58
Figura 13. Tipos de lesiones mucosas en Bolivia.....	59
Figura 14. Reservorios de <i>Leishmania</i> en zonas endémicas de Bolivia	61
Figura 15. Ambiente del peri- e intra-domicilio en la zona endémica de leishmaniosis de Villa Tunari (Chapare, Cochabamba, Bolivia) con trampa luminosa de captura de flebotomos	62
Figura 16. Técnicas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de la LT en Bolivia.....	64
Figura 17. Toma de muestras biológicas para el diagnóstico de la LT	65

LISTADO DE TABLAS

Tabla	PÁG.
Tabla 1A. Número de casos de leishmaniosis cutánea en las Américas.....	20
Tabla 1B. Número de casos de leishmaniosis visceral en las Américas.....	20
Tabla 2. Taxonomía del género <i>Leishmania</i>	25
Tabla 3. Especies de <i>Leishmania</i> encontradas en el ser humano en el NM.....	29
Tabla 4. Recomendaciones de la OPS para el tratamiento de la LC en las Américas	52
Tabla 5. Especies de <i>Leishmania</i> que circulan causando LT en las áreas endémicas de Bolivia	57
Tabla 6. Especies de <i>Leishmania</i> aisladas de reservorios y flebotomos en Bolivia	63

RESUMEN/ABSTRACT/RÉSUMÉ

RESUMEN

En Bolivia, la leishmaniosis tegumentaria (LT) abarca siete de los nueve departamentos, siendo uno de los países que presenta un mayor número de casos de leishmaniosis mucosa (LM) o leishmaniosis mucocutánea (LMC). Debido a que existen enfermedades tropicales de otra etiología, que presentan una clínica similar, y a la toxicidad, elevado coste y escasa disponibilidad de los fármacos utilizados en el tratamiento, es necesario la confirmación de la enfermedad por técnicas de laboratorio. El diagnóstico de la leishmaniosis, se realiza por examen parasitológico directo (EPD) y cultivo, siendo el primero el más utilizados en laboratorios de baja complejidad mientras que el cultivo se realiza en laboratorio de referencia. La caracterización de especies de *Leishmania* en el país se realiza en forma esporádica y solo con fines epidemiológicos o de investigación y la técnica utilizada es la PCR-RFLP. Dicha caracterización permitiría realizar el pronóstico de la enfermedad, mejorar su seguimiento y actualizar la distribución epidemiológica de las cepas que circulan en Bolivia. El objetivo general del presente trabajo es optimizar el diagnóstico parasitológico de la LT y caracterizar la/s especie/s de *Leishmania* causante/s del cuadro clínico en pacientes que asisten al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la UMSS en Cochabamba, Bolivia. La caracterización se ha realizado mediante secuenciación del fragmento de 1245 pb del gen *hsp70* y el MALDI-TOF MS, analizándose 55 cepas aisladas de 44 pacientes. Se identificaron 44 cepas del complejo *L. braziliensis*, 2 cepas de *L. lainsoni*, 1 cepa de *L. guyanensis* y 8 cepas del complejo *L. mexicana*. La caracterización por secuenciación del complejo *L. braziliensis* reveló la presencia de *L. braziliensis* “sensu stricto”, *L. peruviana*, una tercera posible especie, *L. braziliensis* outlier, y 2 posibles híbridos de *L. braziliensis*/*L. peruviana*. MALDI-TOF, ha caracterizado de forma correcta todas las cepas de *Leishmania* a nivel de género, subgénero y complejo y el 81,8% a nivel de especie. Las cepas mal identificadas correspondieron a 1 cepa de *L. peruviana*, identificada como *L. braziliensis* s.str., 2 híbridos *L. braziliensis*/*L. peruviana*, identificadas como *L. braziliensis*, 2 *L. mexicana*, identificadas como *L. amazonensis*, y 5 híbridos de *L. mexicana*/*L. amazonensis* identificadas como *L. amazonensis* (2) y *L. garnhami* (3). Tan sólo 1 de las cepas del complejo *L. mexicana* fue correctamente identificada como *L. amazonensis*. Si se eliminan los híbridos, se incrementa el rendimiento del MALDI-TOF al 93,5%, por lo que, debido a su rapidez en la obtención de resultados, su simplicidad, el menor coste para la identificación de aislamientos de *Leishmania*, una vez obtenido el cultivo, y su facilidad de

integrarse a un laboratorio clínico, podría constituirse como una estrategia de caracterización de especies de *Leishmania* en países endémicos donde aún no se tienen implementada la caracterización molecular. El complejo *L. braziliensis* ha presentado una gran diversidad genética por secuenciación, caracterizándose 9 genotipos diferentes de *L. braziliensis* outlier en 16 cepas analizadas en relación a *L. braziliensis* (6 genotipos en 24 cepas) y *L. peruviana* (1 genotipo en 1 cepa), característica que la posiciona a mayor distancia genética de *L. braziliensis* y *L. peruviana*. Es la primera vez que se aísla *L. peruviana* en Bolivia, en un paciente con LM y con falla terapéutica (FT). También se ha aislado *L. braziliensis* s. str. de LM en 8 pacientes, 6 de éstos con FT, y *L. braziliensis* outlier de 1 paciente, ninguno con FT. La evaluación de las técnicas parasitológicas (EPD, cultivo en TSTB, minicultivo y microcultivo en medio Schneider) utilizando dos tipos de muestras (aspirado: 121 y raspado: 121), ha permitido demostrar que el raspado de los bordes de la lesión es más sensible (81%) que el aspirado (78%) para el diagnóstico de LT, independientemente de la técnica utilizada. El porcentaje de positividad en los cultivos, aumenta con el tiempo de cultivo, independientemente del método utilizado hasta el día 28, por lo que sugiere que los cultivos deben mantenerse durante este tiempo. A pesar de observarse contaminación bacteriana, por levaduras y hongos filamentosos en un 18,32% de los cultivos, se observó crecimiento de las leishmanias en un 17% de los medios contaminados. Si bien el EPD puede seguir utilizándose en el diagnóstico de la LT dada la simplicidad en su ejecución, la seguridad para el personal de laboratorio y el menor traumatismo para el paciente, se recomienda la implementación del cultivo en TSTBS en el diagnóstico de la LT por su sensibilidad (98%), buena correlación con el estándar de diagnóstico (k-Cohen 0,88) y coeficiente de fiabilidad satisfactorio (α -Cronbach $\geq 0,91$), siendo necesario capacitar al personal de los laboratorios de segundo y tercer nivel en Bolivia para su implementación.

ABSTRACT

In Bolivia, tegumentary leishmaniasis (TL) covers seven of the nine departments, being one of the countries with the highest number of cases of mucosal leishmaniasis (ML) or mucocutaneous leishmaniasis (MCL). Because there are tropical diseases of other etiologies, which present similar symptoms, and due to the toxicity, high cost and limited availability of the drugs used in the treatment, confirmation of the disease by laboratory techniques is necessary. The diagnosis of

leishmaniasis is made by direct parasitological examination (DPE) and culture, the first being the most used in low complexity laboratories while the culture is performed in a reference laboratory. The characterization of *Leishmania* species in the country is carried out sporadically and only for epidemiological or research purposes and the technique used is PCR-RFLP. Such characterization would allow for the prognosis of the disease, improving its monitoring and updating the epidemiological distribution of the strains circulating in Bolivia. The general objective of the present work is to optimize the parasitological diagnosis of TL and characterize the *Leishmania* species(s) causing the clinical picture in patients attending the Parasitology Laboratory of the Faculty of Medicine of the UMSS in Cochabamba, Bolivia. The characterization was carried out by sequencing the 1245 bp fragment of the *hsp70* gene and MALDI-TOF MS, analyzing 55 strains isolated from 44 patients. 44 strains of the *L. braziliensis* complex, 2 strains of *L. lainsoni* (2), 1 strain of *L. guyanensis* and 8 strains of the *L. mexicana* complex were identified. Characterization by sequencing of the *L. braziliensis* complex revealed the presence of *L. braziliensis* “sensu stricto”, *L. peruviana*, a third possible species, *L. braziliensis* outlier, and 2 possible hybrids of *L. braziliensis/L. peruviana*. MALDI-TOF has correctly characterized all *Leishmania* strains at the genus, subgenus and complex level and 81.8% at the species level. The misidentified strains corresponded to 1 *L. peruviana* strain, identified as *L. braziliensis s.str.*, 2 *L. braziliensis/L. peruviana*, identified as *L. braziliensis*, 2 *L. mexicana*, identified as *L. amazonensis*, and 5 hybrids of *L. mexicana/L. amazonensis*, identified as *L. amazonensis* (2) and *L. garnhami* (3). Only 1 of the strains of the *L. mexicana* complex was correctly identified as *L. amazonensis*. If the hybrids are eliminated, the performance of MALDI-TOF increases to 93.5%, therefore, due to its speed in obtaining results, its simplicity, the lower cost for the identification of *Leishmania* isolates, once the culture obtained, and its ease of integration into a clinical laboratory, could be constituted as a strategy for characterization of *Leishmania* species in endemic countries where molecular characterization has not yet been implemented. The *L. braziliensis* complex has presented great genetic diversity by sequencing, characterizing 9 different genotypes of *L. braziliensis* outlier in 16 strains analyzed in relation to *L. braziliensis* (6 genotypes in 24 strains) and *L. peruviana* (1 genotype in 1 strain), a characteristic that positions it at greater genetic distance from *L. braziliensis* and *L. peruviana*. This is the first time that *L. peruviana* has been isolated in Bolivia, in a patient with ML and therapeutic failure (TF). *L. braziliensis s.str.* has also been isolated of

ML in 8 patients, 6 of them with TF, and *L. braziliensis* outlier in 1 patient, none of them with TF. The evaluation of parasitological techniques (DPE, culture in TSTB, miniculture and microculture in Schneider medium) using two types of samples (aspirate: 121 and scraping: 121), has allowed us to demonstrate that scraping the edges of the lesion is more sensitive (81%) than aspirate (78%) for the diagnosis of TL, regardless of the technique used. The percentage of positivity in cultures increases with culture time, regardless of the method used until day 28, which suggests that cultures should be maintained during this time. Despite bacterial contamination, yeasts and filamentous fungi being observed in 18.32% of the cultures, leishmania growth was observed in 17% of the contaminated media. Although the DPE can continue to be used in the diagnosis of TL, given the simplicity in its execution, the safety for laboratory personnel and the lesser trauma for the patient, the implementation of culture in TSTBS is recommended in the diagnosis of TL by its sensitivity (98%), good correlation with the diagnostic standard (k-Cohen 0.88) and satisfactory reliability coefficient (α -Cronbach ≥ 0.91), making it necessary to train the personnel of the second and third level laboratories in Bolivia for its implementation.

RÉSUMÉ

En Bolivie, la leishmaniose tégumentaire (LT) couvre sept des neuf départements, étant l'un des pays avec le plus grand nombre de cas de leishmaniose muqueuse (LM) ou de leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM). Étant donné qu'il existe des maladies tropicales d'autres étiologies, qui présentent des symptômes similaires, et en raison de la toxicité, du coût élevé et de la disponibilité limitée des médicaments utilisés pour le traitement, la confirmation de la maladie par des techniques de laboratoire est nécessaire. Le diagnostic de la leishmaniose se fait par examen parasitologique direct (EPD) et culture, le premier étant le plus utilisé dans les laboratoires de faible complexité tandis que la culture est réalisée dans un laboratoire de référence. La caractérisation des espèces de *Leishmania* dans le pays est réalisée de manière sporadique et uniquement à des fins épidémiologiques ou de recherche et la technique utilisée est la PCR-RFLP. Une telle caractérisation permettrait d'établir le pronostic de la maladie, d'améliorer sa surveillance et d'actualiser la répartition épidémiologique des souches circulant en Bolivie. L'objectif général du présent travail est d'optimiser le diagnostic parasitologique de la LT et de caractériser la ou les espèces de *Leishmania* provoquant le tableau clinique chez les patients fréquentant le Laboratoire

de Parasitologie de la Faculté de Médecine de l'UMSS de Cochabamba, Bolivie. La caractérisation a été réalisée par séquençage du fragment de 1245 pb du gène *hsp70* et MALDI-TOF MS, en analysant 55 souches isolées de 44 patients. 44 souches du complexe *L. braziliensis*, 2 souches de *L. lainsoni*, 1 souche de *L. guyanensis* et 8 souches du complexe *L. mexicana* ont été identifiées. La caractérisation par séquençage du complexe *L. braziliensis* a révélé la présence de *L. braziliensis* "sensu stricto", *L. peruviana*, une troisième espèce possible, *L. braziliensis* atypique et 2 hybrides possibles de *L. braziliensis/L. peruviana*. MALDI-TOF MS a correctement caractérisé toutes les souches de *Leishmania* au niveau du genre, du sous-genre et du complexe et 81,8 % au niveau de l'espèce. Les souches mal identifiées correspondaient à 1 souche de *L. peruviana*, identifiée comme *L. braziliensis s.str.*, 2 *L. braziliensis/L. peruviana*, identifiées comme *L. braziliensis*, 2 *L. mexicana*, identifiées comme *L. amazonensis*, et 5 hybrides *L. mexicana/L. amazonensis* identifiés comme *L. amazonensis* (2) et *L. garnhami* (3). Seule une des souches du complexe *L. mexicana* a été correctement identifiée comme étant *L. amazonensis*. Si les hybrides sont éliminés, la performance de MALDI-TOF augmente à 93,5%, donc, en raison de sa rapidité d'obtention des résultats, de sa simplicité, du moindre coût pour l'identification des isolats de *Leishmania*, une fois la culture obtenue, et de sa facilité d'intégration en laboratoire clinique, pourrait constituer une stratégie de caractérisation des espèces de *Leishmania* dans les pays endémiques où la caractérisation moléculaire n'a pas encore été mise en œuvre. Le complexe *L. braziliensis* a présenté une grande diversité génétique par séquençage, caractérisant 9 génotypes différents de *L. braziliensis* atypique dans 16 souches analysées en relation avec *L. braziliensis* (6 génotypes dans 24 souches) et *L. peruviana* (1 génotype dans 1 souche), une caractéristique qui la positionne à une plus grande distance génétique de *L. braziliensis* et *L. peruviana*. C'est la première fois que *L. peruviana* est isolée en Bolivie, chez un patient atteint de LM et d'échec thérapeutique (ET). *L. braziliensis s.str.* a également été isolée de LM chez 8 patients, dont 6 avec ET, et de *L. braziliensis* atypique chez 1 patient, aucun d'entre eux avec ET. L'évaluation des techniques parasitologiques (EPD, culture en TSTB, miniculture et microculture en milieu Schneider) utilisant deux types d'échantillons (aspiration : 121 et grattage : 121), a permis de démontrer que le grattage des bords de la lésion est plus sensible (81%) que l'aspiration (78%) pour le diagnostic de la LT, quelle que soit la technique utilisée. Le pourcentage de positivité dans les cultures augmente avec la durée de la culture, quelle que soit la méthode utilisée, jusqu'au jour 28, ce qui suggère que les

cultures doivent être maintenues pendant cette période. Malgré une contamination bactérienne, des levures et des champignons filamenteux étant observés dans 18,32% des cultures, une croissance des leishmanies a été observée dans 17% des milieux contaminés. Bien que l'EPD puisse continuer à être utilisé dans le diagnostic de la LT compte tenu de la simplicité de son exécution, de la sécurité du personnel de laboratoire et du moindre traumatisme pour le patient, la mise en œuvre de la culture en TSTBS est recommandée dans le diagnostic de la LT par sa sensibilité (98%), bonne corrélation avec la standard de diagnostic (k-Cohen 0,88) et le coefficient de fiabilité satisfaisant (α -Cronbach $\geq 0,91$), rendant nécessaire la formation du personnel des laboratoires de deuxième et troisième niveaux en Bolivie pour sa mise en œuvre.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 LAS LEISHMANIOSIS COMO ENFERMEDADES DESATENDIDAS

Las leishmaniosis constituyen una de las veinte enfermedades infecciosa desatendidas (Gyorkos et al., 2023), que afectan, principalmente, a las personas más pobres que no tienen mucho acceso defictario a los servicios de salud (OPS/OMS, 2022a). El agente causal de las leishmaniosis, son diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*, que incluyen más de 20 especies capaces de infectar a los seres humanos y a los animales (Akhoundi et al., 2016). La transmisión se produce a través de la picada de hembras de insectos dípteros flebotominos (OPS/OMS, 2019; World Health Organization, 2022).

El ser humano infectado con *Leishmania*, puede presentar un conjunto de síndromes clínicos que pueden comprometer la piel, las mucosas y las vísceras (OPS/OMS, 2019). La enfermedad, está asociada a la malnutrición, la presencia de otras enfermedades concomitantes, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda y saneamiento ambiental, la debilidad del sistema inmunitario, la falta de recursos y medidas de protección, así como también a los cambios ambientales, como la deforestación, los sistemas de riego y la urbanización (Alvar et al., 2006; Valero & Uriarte, 2020). A parte de las dificultades económicas, los desastres naturales, conflictos armados y turismo son la causa de que poblaciones susceptibles migren a zonas endémicas, donde la exposición a la infección puede dar lugar a epidemias (Reithinger et al., 2007).

En Latinoamérica constituye un problema de salud de gran magnitud, por el aumento del número de casos y por el impacto socioeconómico y psicológico de la enfermedad (Sandoval & Minaya, 2011). Este problema radica en que la detección y el tratamiento de los pacientes depende del médico y profesionales de la salud, por lo que las acciones de control de la enfermedad sólo se dirigen a los entornos biomédicos y raramente se observan acciones político-sociales organizadas. Por estos motivos, la enfermedad está relacionada a bajos niveles de escolaridad en la población, con casos dispersos en una vasta extensión geográfica, agravándose por ser indebidamente conocida como enfermedad que no lleva a la muerte (DNDi, 2017).

En el Nuevo Mundo (NM), el riesgo histórico de la leishmaniosis cutánea (LC) aparece asociado de manera positiva, en forma decreciente, con los conglomerados Amazónico, Andino y Sabana.

La falta de terrenos agrícolas en las zonas andinas de países endémicos, ha provocado la migración de poblaciones no inmunes hacia explotaciones agrícolas en las selvas de la cuenca amazónica o cercanas a ella, donde la LC es endémica (Maia-Elkhoury et al., 2021; OMS, 2010)

En el Viejo Mundo (VM), en zonas pobres como en la India, a pesar de los avances en el diagnóstico, el tratamiento y la investigación científica básica, la leishmaniosis continúa arraigada en la pobreza y sigue siendo desatendida, por un control inadecuado de los vectores, la falta de vacuna y el acceso insuficiente para desarrollar nuevos medicamentos asequibles (Murray et al., 2005). Por su parte, en Etiopia, si bien existe un programa para leishmaniosis visceral (LV), no existe un programa nacional de LC que desarrolle tratamiento para esta patología, debido que no existe información científica suficiente para su control (DNDi, 2018).

1.1.1 FORMAS CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIOSIS

Las leishmaniosis se caracterizan por un gran polimorfismo clínico, que dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada y la respuesta inmune del hospedador, puede manifestarse como formas clínicas cutáneas (LC) autolimitadas, hasta formas más graves como la leishmaniosis mucosa (LM) o mucocutánea (LMC), y la LV (OPS/OMS, 2017). Las leishmaniosis que afectan a la piel y mucosas, se conocen como leishmaniosis tegumentaria (LT).

La infección se inicia con la picadura del flebotomino en el ser humano, produciendo luego una mácula de aproximadamente medio centímetro de diámetro, usualmente rodeada de un halo más claro, que perdura de 1 a 2 días. El período de incubación varía entre 2 semanas y 2 meses (OPS/OMS, 2019). Los individuos infectados por *Leishmania* pueden presentar un amplio espectro de síntomas clínicos (polimorfismo clínico) (Bastien, 2011).

La respuesta Th1 primaria, se traduce en el control de los parásitos intracelulares y bajos niveles de parasitemia; en la respuesta Th2 la neutralización de anticuerpos es ineficaz contra el parásito intracelular y se da una mayor carga parasitaria con diseminación que conduce a una enfermedad visceral o a la cutánea diseminada (LCD) (Mann et al., 2021). En América latina, la forma clínica más prevalente es la LC (92,6%) siendo mucho menor la de LMC (4,5%) (Goto & Lauletta Lindoso, 2010; OPS/OMS, 2022b) . La LV se presenta con prevalencias más bajas.

1.1.1.1 Leishmaniosis cutánea

La LC constituye la forma más compleja de diagnosticar, por la diversidad de lesiones cutáneas que provoca. Las LC, clínicamente pueden presentarse como lesiones cutáneas localizadas (LCL), cutáneas difusas o diseminada (LCD), LM o LMC y LC post-kala-azar (Mokni, 2019).

Producida la infección, y después de un periodo prepatente, aparece un eritema en el lugar de la picadura que da lugar a una pápula y, posteriormente, a los tres meses de la infección, a una lesión ulcerada, redondeada e indolora, que va aumentando progresivamente de tamaño (Murray et al., 2005; OPS/OMS, 2019; Reithinger et al., 2007). Las úlceras cutáneas pueden ser únicas o múltiples, lesiones satélites o linfangitis nodular (Aramayo et al., 2022; De Vries, et al., 2015). En la LCL las lesiones pueden autocurarse, dejando una cicatriz cutánea de por vida que puede causar un trauma en los individuos que la presentan (Reithinger et al., 2007).

La LCD, se caracteriza por múltiples pápulas y nódulos no dolorosos, no ulcerosos y diseminados semejante a la lepra lepromatosa, pudiendo cubrir todo el cuerpo (Burza, et al., 2018; Reithinger et al., 2007). Las regiones más afectadas son las orejas, la nariz, el labio superior, las mejillas, piernas, manos y antebrazos y tobillos (Torres-Guerrero et al., 2017). También pueden presentarse lesiones nodulares con linfangitis (Mokni, 2019). Es difícil de tratar y no se autocura (Reithinger et al., 2007).

La LC post-kala-azar da lugar a lesiones cutáneas que suelen presentarse como pequeños nódulos o ulceraciones.

1.1.1.2 Leishmaniosis mucosa y leishmaniosis mucocutánea

La LM, constituye otra de las importantes manifestaciones clínicas de la LT del NM, también conocida como “espundia”. La diseminación del parásito de las lesiones cutáneas a las mucosas parece ser a través del sistema linfático o los vasos sanguíneos. La LMC comienza con inflamación y congestión nasal, seguida de ulceración de la mucosa nasal y perforación del tabique (Reithinger et al., 2007). En algunos casos, causa una destrucción extensa de las cavidades oronasal y faríngea con lesiones desfigurantes (Bañuls et al., 2007). Es muy difícil de tratar, se acompaña frecuentemente de infecciones bacterianas secundarias permanentes y nunca cura espontáneamente. La LM es potencialmente mortal, puede provocar desfiguración permanente,

por lo que debe de diagnosticarse y tratarse rápidamente (Burza et al., 2018). En ocasiones, la LM se origina después de que haya curado una LC, pero hay ocasiones en que se presentan de forma concomitante dando lugar a una LMC (Reithinger et al., 2007).

Existen varios informes que indican que los casos de LM del VM son menos graves que los del NM y que tienen una tasa más baja de afectación de la cavidad nasal (15% y 90%, respectivamente), así como un mejor pronóstico después del tratamiento (82%) (Mathison & Bradley, 2022).

1.1.1.3 Leishmaniosis visceral

La LV sistémica, que afecta a órganos internos como el hígado, el bazo y médula ósea, es letal si no se trata adecuadamente (De Vries et al., 2015). Afecta principalmente a los niños menores de cinco años y puede estar asociada a la desnutrición, condiciones de inmunosupresión como VIH-SIDA y a otras comorbilidades (OPS/OMS, 2019). La LV puede presentarse en forma subclínica, oligosintomática y sintomática y pueden presentarse recaídas a los 6 - 12 meses después de administrar un tratamiento aparentemente eficaz, o reactivación tardía (Murray et al., 2005). Los signos clínicos más frecuentes son la fiebre, palidez de las mucosas, debilidad, sudores nocturnos, anorexia y pérdida de peso, y progresan durante semanas o meses. Se acompaña de hepatoesplenomegalia y/o adenopatías, pérdida de peso progresiva, aumento del volumen abdominal, anemia, leucopenia o trombocitopenia e hipergammaglobulinemia. Si no se trata puede producir caquexia profunda, afectación multisistémica, epistaxis y muerte (Bañuls et al., 2011; Burza et al., 2018; Murray et al., 2005).

1.1.2 CICLO BIOLÓGICO DE LAS LEISHMANIAS Y TIPOS DE CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LAS LEISHMANIOSIS

El ciclo biológico de *Leishmania* spp. es indirecto, transcurriendo entre un hospedador vertebrado, normalmente un mamífero, y otro invertebrado (Dostálová & Volf, 2012) (Figura 1). Se inicia cuando el hospedador invertebrado, una hembra infectada del insecto vector (flebotomo) se alimenta de sangre humana u otro hospedador vertebrado y deposita las formas promastigotas metacíclicas en la piel del hospedador vertebrado (Killick-Kendrick, 1990).

El desarrollo en el vector se inicia cuando los flebotomos vuelven a picar a un hospedador vertebrado. Los flebotomos insertan sus piezas bucales en forma de sierra en la piel y las agitan para producir una pequeña herida en la que la sangre fluye desde los capilares superficiales y se produce un daño tisular, asociado con la creación de la herida, lo que libera macrófagos de la piel y/o amastigotes liberados en el charco de sangre y permite su posterior absorción en el abdomen de los flebotomos (Bates, 2007). Una vez en el intestino, y hasta alcanzar la diferenciación de promastigotes metacíclicos o infectivos (metacicloogénesis), los parásitos se suceden en una serie de estadios que incluyen los promastigotes procíclicos, las formas promastigotes de nectomonadas, leptomonadas y haptomonadas (Bates, 2007, 2018). Las primeras se desarrollan en el interior de la membrana peritrófica del flebotomo, donde se multiplican por fisión binaria, mientras que los nectomonadas atraviesan la membrana peritrófica en la luz del intestino medio y se desplazan hacia el intestino medio anterior. Allí, se transforman en leptomonadas, que se multiplican, y migran hacia regiones más anteriores de la válvula estomodeal y proboscis, donde se transforman en estadios de promastigotes metacíclicos (Bates, 2007; Dostálová & Volf, 2012)

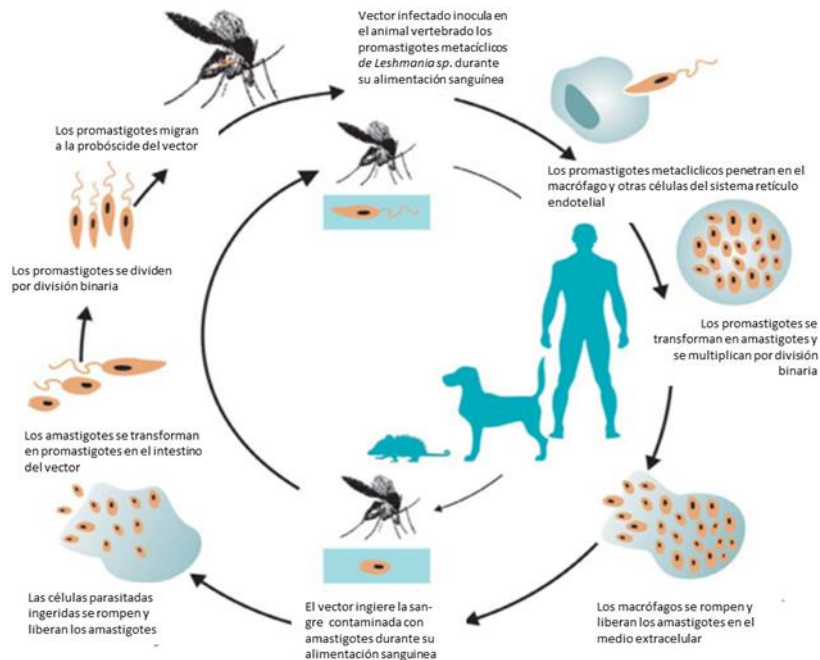


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (tomado de OPS/OMS, 2019)

Los parásitos, en las diferentes etapas de desarrollo, deben sobrevivir a un ataque proteolítico dentro de la ingesta sanguínea en el intestino medio de la hembra de flebotomo, escapar de la membrana peritrófica, prevenir la excreción con sangre digerida al inhibir el peristaltismo y

adhiriéndose al epitelio del intestino medio o del intestino posterior, según el tipo de *Leishmania*, evitar la competencia de la microbiota intestinal y encontrar nutrientes para la morfogénesis y migración al intestino medio anterior antes de que se transmitan a un hospedador vertebrado en una ingesta sanguínea posterior (Ready, 2013).

En los flebotomos infectados con promastigotes de *Leishmania*, el intestino medio anterior está bloqueado por un gel de origen parásito, el gel secretor de promastigotes y cuando éstos pican, las leishmanias son regurgitadas con un reflujo de sangre ingerida o bien un número limitado de promastigotes metacíclicos que están en la probóscide se deposita en la piel del hospedador vertebrado durante la alimentación (Bates, 2018; Dostálová & Volf, 2012; Rogers et al., 2004). La picadura provoca que se liberen sustancias que inducen una rápida infiltración de neutrófilos y macrófagos en la piel (Peters et al., 2008).

Cuando el parásito se deposita en la piel del hospedador, penetra y es fagocitado por células mononucleares, como macrófagos epidérmicos, células de Langerhans y fibroblastos dando lugar a la LCL (Mathison & Bradley, 2022; Teixeira et al., 2013). Los promastigotes, una vez dentro del fagosoma de las células, se transforman por metaciclogénesis en formas amastigotes que se multiplican por fisión binaria, estallando las células una vez repletas. Los amastigotes fagocitados pueden diseminarse por la piel y circulación sanguíneas hasta alcanzar las mucosas (LM) o a través de la sangre y los ganglios linfáticos, alcanzando las vísceras (LV) (Lainson & Shaw, 1987; Mathison & Bradley, 2022) (**Figura 1**).

Paralelamente a los cambios morfológicos, se suceden cambios bioquímicos, donde se expresan moléculas exclusivas en el promastigote infectivo o metacíclico como lipofosfoglicano (LPG) y la glucoproteína GP63 que se expresan abundantemente en la superficie del promastigotes (sub genero *Leishmania*), disminuyendo su expresión o estando ausentes en las formas amastigotes (Muskus & Marín Villa, 2002).

La localización del parásito en piel, mucosas o vísceras, y el desarrollo de la enfermedad clínica, depende tanto de la virulencia del parásito (especie, cepas), como del hospedador y de factores dependientes del vector, como pueden ser la dosis, la vía de inoculación o componentes de la saliva (Reithinger et al., 2007). Algunos estudios han correlacionado la clínica a la existencia de especies o cepas con determinados tropismos (dermotropismo o viscerotropismo). Sin embargo, otros estudios no consiguen identificar tal correlación y subrayan el papel complementario del

hospedador y otros factores en la presentación clínica (Reithinger et al., 2007). La activación primaria de células T colaboradoras (Th1/Th2) es importante para el desarrollo y el curso posterior de la infección. La respuesta de tipo celular (Th1) ejerce buen control de los parásitos, con bajos niveles de parasitemia, lo que daría lugar a la aparición de lesiones limitadas, cutáneas, y previene el recrudecimiento de la infección crónica latente, mientras que la respuesta humoral (Th2) probablemente previene la destrucción tisular extensa, hay una mayor carga parasitaria y promueve la infección intracelular (Mann et al., 2021; Mathison & Bradley, 2022; Reithinger et al., 2007). La saliva de los flebotomos contiene numerosos péptidos salivales. Algunos de estos péptidos ayudan a controlar las infecciones por *Leishmania* (inmunidad mediada por células de tipo Th1), mientras que otras las exacerbaban (inmunidad mediada por células de tipo Th2) (Ready, 2013).

En las Américas, se han caracterizado tres ciclos principales de transmisión: el selvático, el doméstico-rural y el doméstico-urbano (Figura 2). En el ciclo selvático, la infección humana ocurre cuando el hombre penetra en el bosque o la selva y es picado ahí por los vectores infectados. En este caso, el hombre es un hospedador accidental, que no interviene de forma importante en el ciclo de transmisión, y los reservorios son los animales selváticos. En los ciclos doméstico-rural y doméstico-urbano los vectores llegan al peri-domicilio, ingresan a las viviendas y transmiten la infección al núcleo familiar, con mayor incidencia en los niños. Algunas evidencias, aún no confirmadas, sugieren que tanto el hombre como los animales de comportamiento sinantrópico y los animales domésticos podrían participar como reservorios del ciclo rural-doméstico (Araujo Carreira et al., 2014; OPS/OMS, 2019).



Figura 2. Tipos de ciclos epidemiológicos de las leishmaniosis (tomado de Araujo Carreira et al., 2014)

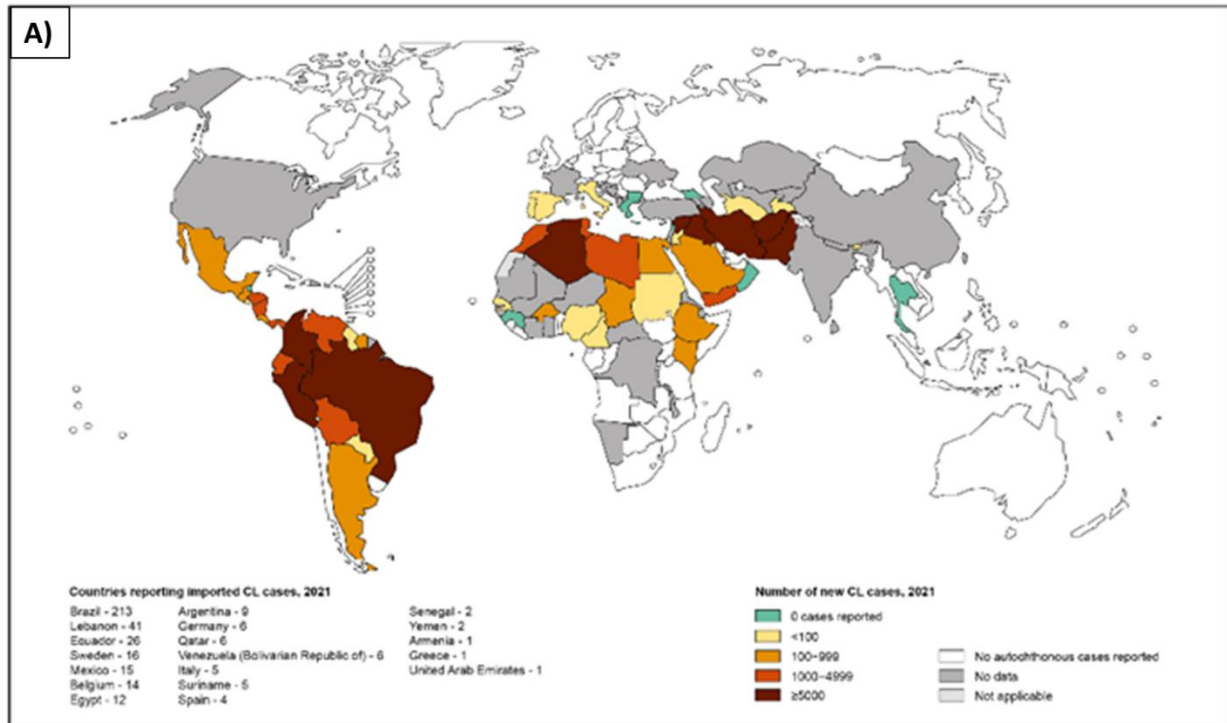
1.1.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS LEISHMANIOSIS

La epidemiología de la leishmaniosis depende de las características de la especie del parásito, de las características ecológicas de los lugares de transmisión, exposición actual y pasada de la población humana al parásito y del comportamiento humano, que es muy variable (OMS, 2010).

A nivel mundial, las leishmaniosis afectan a los cinco continentes y causan un problema de salud en cuatro regiones ecoepidemiológicas del mundo (las Américas, África Oriental, África del Norte y Asia Occidental y Sudoriental) (**Figura 3**). Los últimos datos publicados, en 2021, de leishmaniosis humana (Ruiz-Postigo et al., 2022), recogen que de los 200 países y territorios que informaron datos a la OMS, 99 (49%) fueron considerados países endémicos y 6 habían notificados previamente casos de leishmaniosis. De éstos 200 países o territorios, 89 (45%) fueron considerados endémicos para LC, 3 (2%) tenían casos de LC previamente notificados, 80 (40%) fueron considerados como países endémicos para LV, y 5 (3%) habían notificado previamente casos de LV. Según la clasificación de la OMS, 71 de estos 200 países o territorios (36%) eran países endémicos tanto para LC como para LV. Otras fuentes indican un mayor número de países afectados, 102, 89 para LC, 80 para LV y 71 para las dos formas clínicas (LC y LV) (OPS/OMS, 2019).

Se estima que cerca de 350 millones de personas viven en regiones de riesgo de adquirir la infección. Se registran 1,3 millones de casos nuevos de leishmaniosis y de 20.000 a 30.000 muertes cada año. Según la carga global de enfermedades infecciosas, las leishmaniosis en sus diferentes formas clínicas son responsables de 2,35 millones de años de vida perdidos ajustados por discapacidad (AVAD) (OPS/OMS, 2019).

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis (CL) worldwide, 2021



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2022. All rights reserved

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



Status of endemicity of visceral leishmaniasis (VL) worldwide, 2021

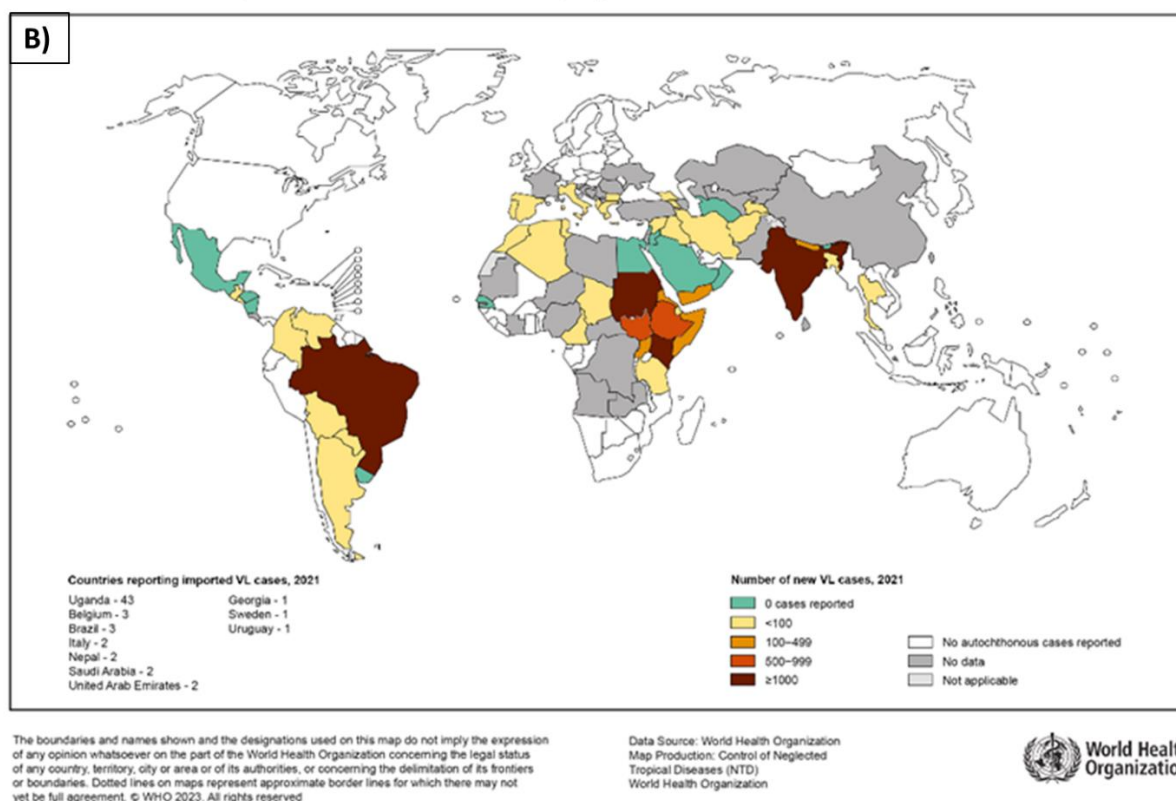


Figura 3. Distribución geográfica de la leishmaniosis (2021): A) LC, B) LV (tomado de WHO (2023).

(A: https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniosis_cl_2021d2cc44b7-4950-41ec-975e-44897d3676b7.png?sfvrsn=19fff3ca_3.

B: https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniosis_vl_2021e2ccf4cc-dd58-471b-876b-d011047d3fd6.png?sfvrsn=caadc6a5_3)

Se calcula que anualmente se producen en todo el mundo entre 50.000 y 90.000 nuevos casos de LV, de los que solo se notifican a la OMS entre un 25% y un 45%. Esta puede desencadenar brotes y resultar mortal. Se calcula que cada año se dan en el mundo entre 600.000 y 1 millón de nuevos casos de LC, pero solo 200.000 de ellos son notificados a la OMS. Alrededor del 95% de los casos se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central (OMS, 2023). De los casos declarados de LM, más del 90% se dan en el Estado Plurinacional de Bolivia, Brasil, Etiopía y el Perú (OMS, 2023).

1.1.3.1 La leishmaniosis en las Américas

En las Américas, se han registrado casos humanos de leishmaniosis desde el sur de los Estados Unidos, hasta el norte de Argentina, con excepción de Chile (OPS/OMS, 2019) (Tablas 1A y 1B). Los casos de LC son muy superiores a los de LV. Dada esta baja presencia de LV y que los estudios llevados a cabo para la presente memoria de tesis doctoral se basan en la LC y LM, ampliaremos a continuación los datos sobre la LT.

La epidemiología de la LC en la zona es compleja, con múltiples especies de *Leishmania* que circulan en la misma área geográfica, varios animales que actúan como reservorios y de especies de flebotomos vectores, y donde las manifestaciones clínicas son variables y con distinta respuesta terapéutica (Burza et al., 2018). Los factores de riesgo que se asocian con la LC, y también la LV, son el estatus socioeconómico asociado a la incidencia de enfermedades en poblaciones humanas vulnerables de las regiones en desarrollo (áridas y tropicales), los factores ambientales y climáticos, que muestran asociaciones significativas con la incidencia de LC, y, finalmente, la proximidad a los remanentes de vegetación natural que incrementa el riesgo de enfermedades tanto en el NM como en el VM, mientras que las condiciones climáticas favorables para la transmisión de enfermedades difieren entre las regiones (OMS, 2010; Valero & Uriarte, 2020).

El patrón de transmisión de la LC en las Américas es de predominancia selvática, cuando la persona ingresa a realizar sus actividades laborales, por lo que el grupo etario más afectado es entre 40 a 50 años (OPS/OMS, 2022b).

Tabla 1A. Número de casos de leishmaniosis cutánea en las Américas

LEISHMANIOSIS CUTÁNEA	2021	2020	2019	2018	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2005
Argentina	328	176	232	303	306	241	334	138	90	173	140	166	163	208	201	257	282
Belize	0	No data	No data	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos
Estado Plurinacional de Bolivia	2166	2059	2046	3127	2283	2222	2231	1683	2016	1767	1598	1440	1487	1650	3153	3152	2657
Brazil	14800	16056	15350	16167	17279	12468	19395	20418	18226	23547	21395	22397	21989	20123	21530	22397	26685
Colombia	6175	6124	5855	6316	7730	10941	7541	11586	9353	9757	9063	14818	15420	9595	13331	16241	18043
Costa Rica	563	528	601	1247	2224	1148	1171	2150	1950	1453	1376	1143	2025	818	1807	1870	1676
Dominican Republic	No data	No data	No data	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos
Ecuador	1225	1025	1040	1237	1632	1197	1479	1175	873	1512	1385	1629	1735	1479	1185	1536	1925
El Salvador	50	38	38	48	44	13	20	29	16	21	17	4	0	31	36	46	24
Guatemala	836	1121	1167	1044	775	835	562	258	664	572	549	410	519	494	287	602	1243
Guyana	3	12	19	27	20	396	132	64	4	7	15	15	9	14	6	6	7
Honduras	1119	1467	1985	1636	1854	2671	2040	1936	2074	1927	1736	1362	1502	1759	855	1300	1574
Mexico	505	324	1014	576	841	444	479	418	970	567	342	456	387	284	443	431	861
Nicaragua	1251	3443	3321	3722	4343	5423	1925	1649	3035	1884	3146	3497	4047	5826	3719	2125	3521
Panama	1286	938	920	1142	1164	1198	930	1581	1762	1811	3221	3221	1866	2109	2199	3774	1649
Paraguay	53	54	51	84	92	134	122	124	162	177	184	262	251	92	535	457	591
Peru	5201	4178	5349	6057	6601	7271	5459	6231	6948	6969	11204	7612	6513	7650	10183	8248	8057
Surinam	139	42	130	114	113	241	241	390	382	594	No datos	291	138	159	161	116	231
República Bolivariana de Venezuela	1802	1597	2031	2592	2310	2057	2013	1661	1638	2104	1551	1952	2248	2392	2464	2553	2550

Datos extraídos de WHO, 2022a. (<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-cases-of-cutaneous-leishmaniosis-reported> (2022-10-31))

Tabla 1B. Número de casos de leishmaniosis visceral en las Américas

	2021	2020	2019	2018	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2005
Argentina	16	11	6	2	9	11	8	11	6	24	15	21	18	19	17	2	0
Estado Plurinacional de Bolivia	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos
Brazil	1492	1954	2526	3460	4098	3123	3223	3453	3253	2770	3894	3716	3693	3852	3604	3651	3597
Colombia	7	8	7	15	29	37	21	31	13	9	11	34	54	33	54	44	66
Costa Rica	No datos	0	0	0	0	0	0	0	0	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos
El Salvador	1	0	0	3	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Guatemala	1	0	1	4	2	2	2	0	1	0	2	0	1	1	No datos	No datos	No datos
Honduras	0	0	3	8	8	7	6	2	3	0	7	7	3	3	4	9	7
Mexico	0	0	1	0	1	0	1	0	4	4	0	9	7	9	9	9	3
Nicaragua	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4	1	1	1
Paraguay	55	26	22	19	34	64	92	118	107	76	114	144	82	54	70	66	21
Uruguay	0	2	0	1	0	0	0	0	0	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos	No datos
República Bolivariana de Venezuela	30	6	23	43	40	33	37	9	7	9	15	15	15	18	17	41	58

Datos extraídos de WHO, 2022b. <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-cases-of-visceral-leishmaniosis-reported> (2022-10-31)

Según datos de la OPS, en los últimos 20 años (2001-2021) se ha registrado un promedio de 53.387 casos por año de LT. En los años 2017-2022, se ha implementado un Plan de acción para fortalecer la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas que ha llevado a una disminución del número de casos por año, siendo de 39.705 en 2021. Sin embargo, esta disminución no es homogénea y así, en países como Argentina, México, Panamá y El Salvador, se ha producido un incremento del 85%, el 60,5%, el 37,1% y el 28,2%, respectivamente, en el año 2021 respecto al 2020. Esto ha estado posiblemente ocasionado por la interrupción total o parcial de actividades de vigilancia o asistencia médica, así como a la escasez o falta de medicamento como consecuencia de la pandemia de COVID-19 (OPS., 2021). Los países con las mayores tasas de incidencia por 100.000 habitantes fueron Suriname (200,3), Panamá (42,8), el Estado Plurinacional de Bolivia (35,8), Perú (35,4) y Guatemala (33,9) (**Figura 4**) (OPS/OMS, 2022b).

A pesar de la disminución del número de casos en las Américas, en el 2021 se observó un aumento del 4,4% en el número de unidades del segundo nivel administrativo (municipios, cantones, provincias, distritos, etcétera) con registro de casos, así como un aumento del 15% en la proporción de casos en las fronteras internacionales en relación con el año anterior. El número e incidencia de casos por 100.000 habitantes de LT en el segundo nivel administrativo queda reflejado en las Figuras 4 A y 4 B.

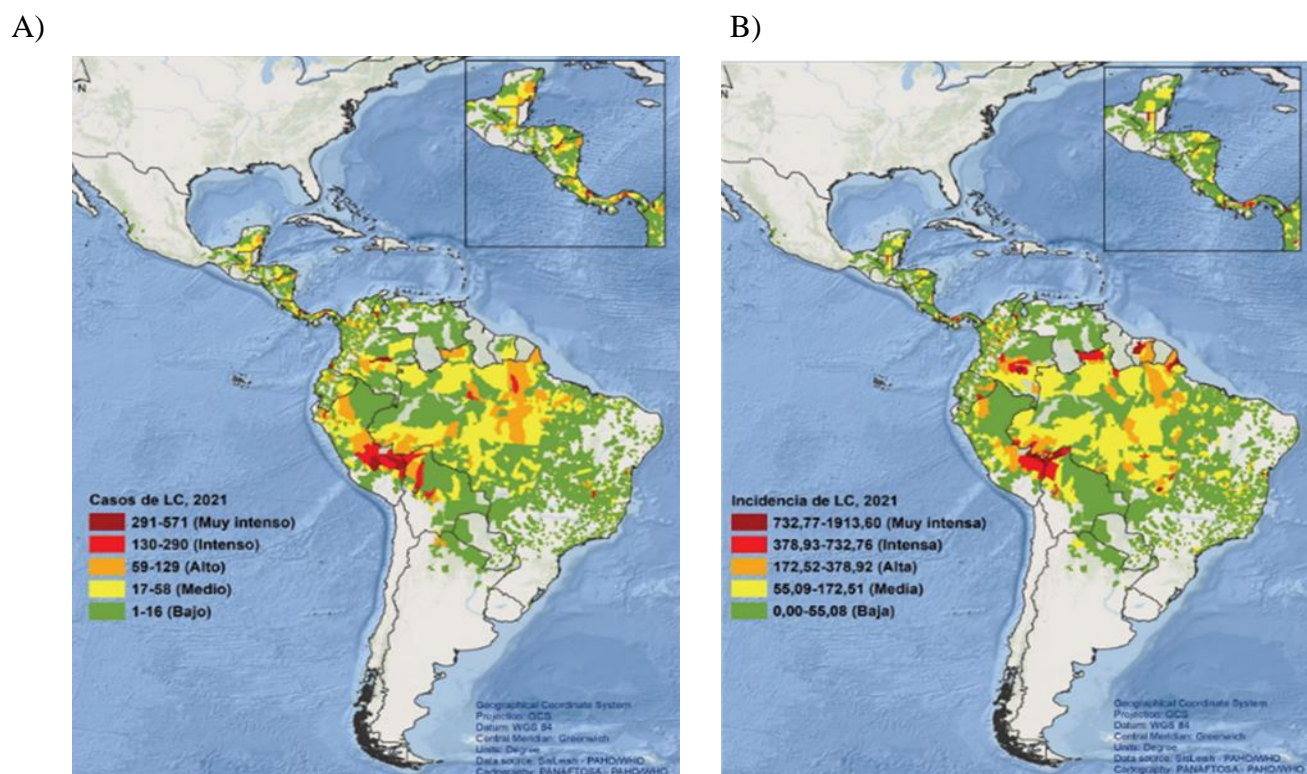


Figura 4. Número de casos (A) e incidencia por 100.000 habitantes (B) de la LC en la Región de las Américas, 2021 (tomado de OPS/OMS, 2022b)

De los 37.786 casos registrados en 2021, el 92,6% (39.975) correspondía a LC y el 4,5% (1687) a LM. Los países con el mayor número de casos de LM siguen siendo Brasil (756), Perú (419) y el Estado Plurinacional de Bolivia (281), sumando el 86% de los casos de la Región de las Américas (OPS/OMS, 2022b).

1.2 EL AGENTE ETIOLÓGICO: LAS LEISHMANIAS

Como ya se ha comentado, las leishmanias presentan diversas formas evolutivas en su ciclo biológico, los amastigotes en el hospedador vertebrado, intracelulares, y los promastigotes, libres en el intestino del hospedador invertebrado, los flebotomos vectores. Ambas formas del parásito se caracterizan, como en otros parásitos Kinetoplásticos, por poseer una única mitocondria modificada conocida como cinetoplasto que contiene ADN extranuclear (ADNm) (Dawit et al., 2013; Lainson & Shaw, 1987; OPS/OMS, 2019).

Los amastigotes, son cuerpos pequeños, redondos u ovalados, que miden aproximadamente 3-5 μm y, cuando se observan al microscopio óptico, presentan en el centro un núcleo redondo u ovalado y un cinetoplasto en forma de varilla. Al microscopio electrónico, se observa el plegamiento de la membrana superficial dando lugar a un "bolsillo flagelar" en el que el flagelo no es funcional y no se extiende más allá del cuerpo celular.

Los promastigotes, alargados, miden entre 8-15 μm , presentan el núcleo y el cinetoplasto y, además, un flagelo libre anterior funcional que le permite la movilidad en el intestino de los flebotomos (**Figura 5**) (Singh, 2006; Sunter & Gull, 2017).

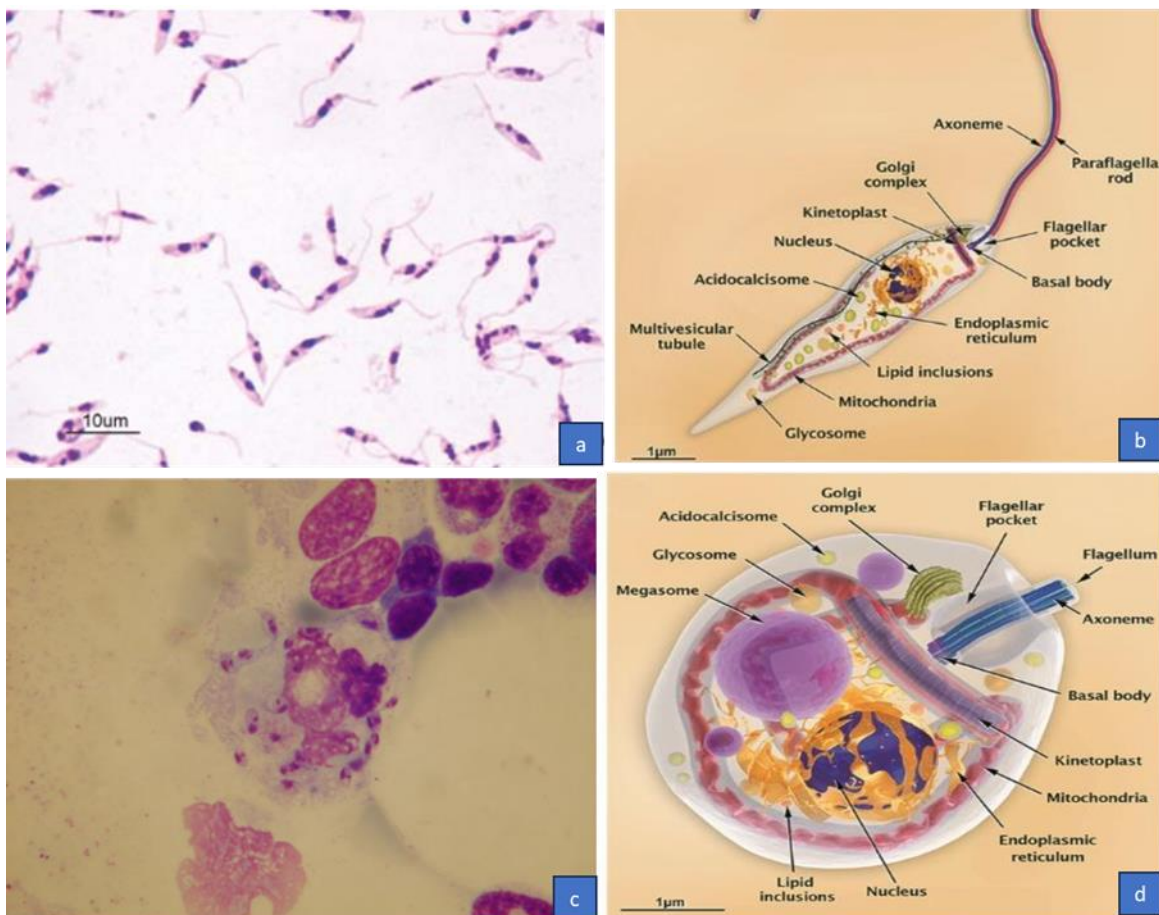


Figura 5. Características morfológicas de *Leishmania* spp. **a.** morfología características de las formas promastigotes teñidas con Giemsa observadas por microscopia óptica. **b.** esquema de las formas promastigotas. **c.** morfología característica de los amastigotes teñidos con Giemsa observados por microscopia óptica. **d.** esquema de formas promastigotes. (a: tomado de OPS/OMS, 2019; b y d: tomado de Teixeira et al., 2013; c: tomado de De Vries, et al., 2015).

El ADN nuclear contiene ADN cromosómico y episómico y mide unos 32 Mbp, tiene pocas secuencias repetidas y las especies de *Leishmania* del VM tienen 36 cromosomas, mientras que las especies del NM contienen de 34 a 35 cromosomas. El ADN del cinetoplasto (ADNk) representa del 10 al 20% del ADN celular total y está compuesto por dos tipos de moléculas circulares interconectadas en una red concatenada: maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos tienen un tamaño de 20 kb de longitud, presentes en unas pocas decenas de copias (25-50 repeticiones), y son análogos al genoma mitocondrial de otros eucariotas, mientras que los minicírculos tienen un tamaño aproximado de 800 pb de largo y están presentes en varios miles de copias (diez mil) en el genoma (Fotouhi-Ardakani et al., 2016; Kazemi, 2011; Kocher et al., 2018).

1.2.1 TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica de las leishmanias ha sido realizada en base a criterios eco-biológicos, como la distribución geográfica, morfológicos, el tropismo y las propiedades antigénicas de los parásitos, las zonas del intestino en que se desarrolla el parásito en el vector, el poder patógeno en animal de experimentación, así como la manifestación clínica con que se presenta la leishmaniosis. Más tarde, se han utilizado criterios bioquímicos, moleculares y proteómicos (Akhoundi et al., 2016; Bañuls et al., 2007; Lainson & Shaw, 1987; Maurício, 2018; Van der Auwera & Dujardin, 2015).

La estructura taxonómica del género *Leishmania* se organiza convencionalmente a nivel de género, subgénero, complejo de especies, especies y subespecie (Akhoundi et al., 2017). La posición taxonómica del género *Leishmania* se indica en la **Tabla 2**.

Estudios realizados, sugieren la presencia de dos linajes filogenéticos importantes claramente divergentes dentro de *Leishmania*, que se propone denominarlos "Secciones" por su analogía con las Secciones dentro del género *Trypanosoma*. Una sección denominada *Euleishmania* y la otra sección denominada *Paraleishmania* (Cupolillo et al., 2000). La primera engloba los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, que incluyen la mayoría de especies que afectan a los seres humanos, *Mundinia*, que también incluye especies parásitas de seres humanos, y *Sauroleishmania*, que incluye parásitos de reptiles, aun cuando últimamente se ha descrito su detección en humanos (**Figura 6**) (Akhoundi et al., 2016; Pombi et al., 2020).

Reino	Protista	Haeckel, 1866
Dominio	Eukaryota	(Cavalier-Smith, 1998)
Reino	Protozoa	(Cavalier-Smith, 2002)
InfraReino	Excavata	(Cavalier-Smith, 2003)
Filum	Euglenozoa	(Cavalier-Smith, 1981)
Clase	Kinetoplastea	Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976
Subclase	Metakinetoplastina	Vickerman, 2004
Orden	Trypanosomatida	(Kent, 1880)
Familia	Trypanosomatidae	(Döflein, 1901)
Subfamilia	Leishmaniinae	Maslov and Lukeš 2012 emend Espinosa et al. 2016
Género	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903
Sección	<i>Euleishmania</i>	Cupolillo et al. 2000
Subgénero	<i>Leishmania</i>	Ross, 1903 sensu Safjanova, 1982
	<i>Viannia</i>	Lainson and Shaw, 1987
	<i>Sauroleishmania</i>	Ranque, 1973
	<i>Mundinia</i>	Shaw et al., 2016
Sección	<i>Paraleishmania</i>	Cupolillo et al. 2000

Tabla 2. Taxonomía del género *Leishmania* (tomado de Akhoundi et al., 2016; Espinosa et al., 2018; Mauricio, 2018)

El subgénero *Viannia* se restringe al Neotrópico y el subgénero *Leishmania* se encuentra tanto en el NM como en el VM. Se reconocen 53 especies y de éstas, 31 especies son parásitas de mamíferos y 22 especies son patógenas para el ser humano (Akhoundi et al., 2016; OPS/OMS, 2023). En el VM están presentes 29 especies, en el NM están presentes 20 especie, tres especies se distribuyen tanto en el VM como en el NM ("*L. siamensis*", *L. martiniquensis* y *L. infantum*), además hay una especie en Australia que afecta a los canguros ("*L. australiensis*") (Akhoundi et al., 2016).

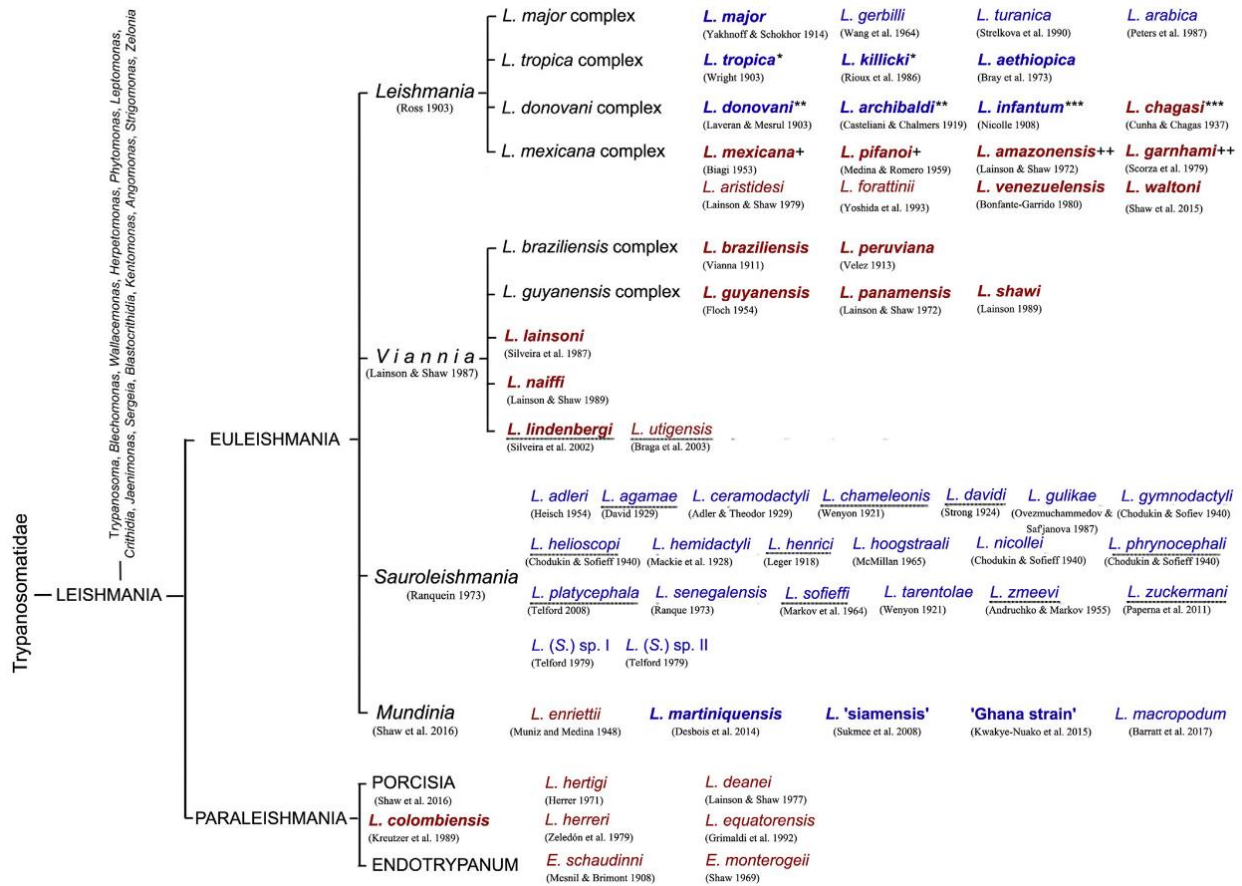


Figura 6. Clasificación taxonómica de las especies de *Leishmania* (*, **, +: especies en sinonimia, Subrayado: Sin clasificación final. Los nombres de *Leishmania* entre comillas son nombres no oficiales sin descripciones formales. Las especies patógenas humanas están escritas en negrita. Las especies del VM y NM están resaltadas en azul y rojo, respectivamente. *L. 'siamensis'* y *L. martiniquensis* también se han encontrado en el NM. (Tomado de Akhouni et al., 2017).

Las especies y subespecies, agrupadas en complejos, están bajo constante revisión y debate con descripciones recientes de nuevas especies crípticas (Ramírez et al., 2016) o inclusive la presencia de cepas híbridas producto de su gran diversidad genética (Hamad et al., 2011).

El número de especies presentes en el NM es superior al de las especies que se localizan en el VM, llegando a estar ocho especies presentes en un país frente a cuatro en países del VM (Akhouni et al., 2017).

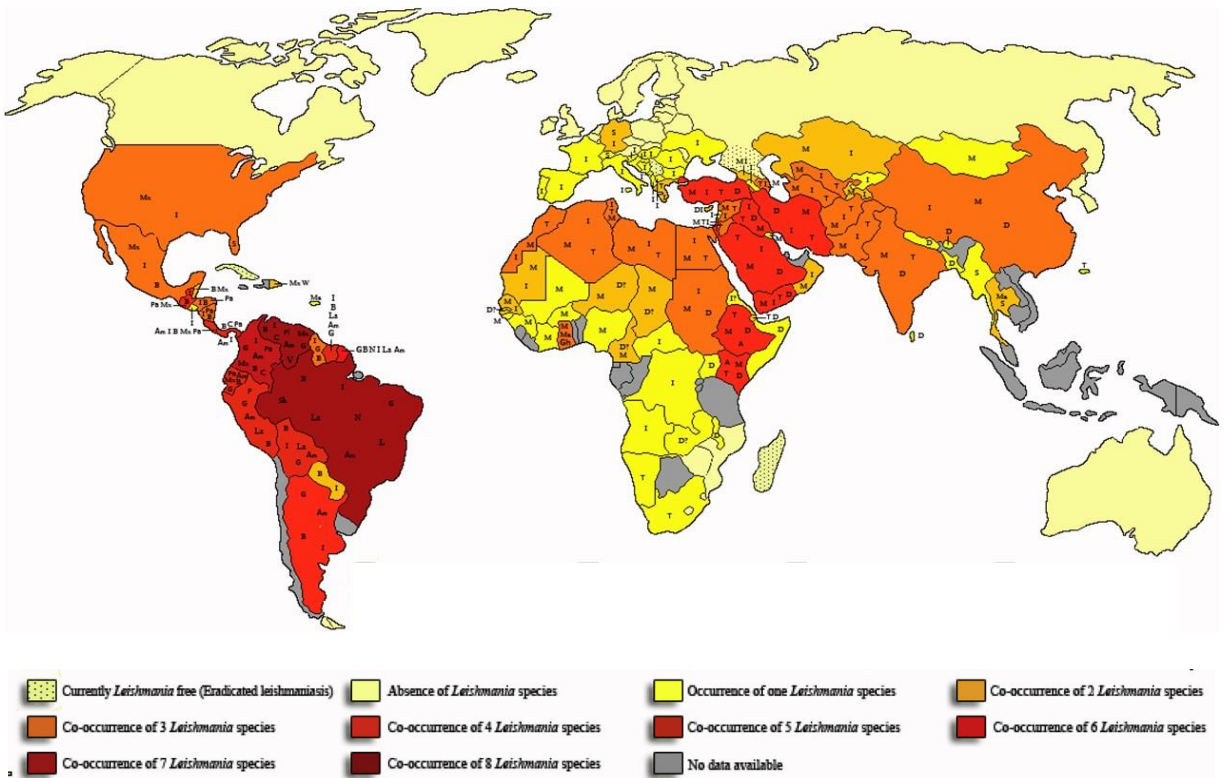


Figura 7. Distribución del número de especies de *Leishmania* consideradas patógenas para el ser humano (tomado de Akhoundi et al., 2017).

1.2.2 COMPLEJOS Y ESPECIES DE *LEISHMANIA* EN LAS AMÉRICAS

El área de distribución de las leishmaniasis se ha subdividido en términos generales en el NM (las Américas) y el VM (África, Asia, Europa) (**Figura 5**). Todas las especies del subgénero *Viannia* se encuentran en el NM, mientras que las del subgénero *Leishmania* se distribuyen principalmente en el VM, excepto el complejo *L. mexicana*, que se encuentran solo en el NM, y *L. infantum* y *L. major*, que se encuentran tanto en el NM como en el VM (Cupolillo et al., 2000).

En Centro y Sudamérica se han detectado especies de los complejos *Viannia* y *Leishmania*, además de otras especies con posición taxonómica no definida (**Tabla 3**).

Leishmania sp.(synonymes)		Old and/or New World	Clinical Disease	Reservoir				Sandfly Vector (potential or proven)	Distribution
				Mammal	Human	Lizard	Insect		
EULEISHMANIA LEISHMANIA (growth in the midgut and foregut of sandfly)	<i>L. mexicana</i> (syn. of <i>L. pifanoi</i>)	NW	CL, DCL	X	X			<i>Lu. (D.) anthophora</i> , <i>Lu. (Hel.) ayacuchensis</i> *, <i>Lu. (C.) christophei</i> , <i>Lu. (V.) columbiana</i> , <i>Lu. (Lu.) cruciata</i> , <i>Lu. (Lu.) diabolica</i> , <i>Lu. (N.) flaviscutellata</i> , <i>Lu. (Lu.) gomezi</i> , <i>Lu. (Lu.) longipalpis</i> , <i>Lu. (Lu.) migonei</i> , <i>Lu. (N.) olmeca olmeca</i> *, <i>Lu. (V.) ovallesi</i> *, <i>Lu. (Psy.) panamensis</i> , <i>Lu. (Ps.) shannoni</i> , <i>Lu. (N.) ylephiletor</i>	United States of America, Ecuador, Peru, Venezuela
	<i>L. amazonensis</i> (syn. of <i>L. gamhiani</i>)	NW	CL, DCL, MCL	X	X			<i>Lu. (Lu.) diabolica</i> , <i>Lu. (N.) flaviscutellata</i> *, <i>Lu. (Lu.) longipalpis</i> *, <i>Lu. (Lu.) nuneztovari anglesi</i> *, <i>Lu. (N.) olmeca novica</i> *, <i>Lu. (N.) olmeca reducta</i> *, <i>Lu. (V.) townsendi</i> , <i>Lu. (N.) ylephiletor</i> , <i>Lu. (V.) youngi</i>	South America (Bolivia, Brazil, Venezuela)
	<i>L. venezuelensis</i>	NW	CL	X	X			<i>Lu. (Lu.) lichi</i> , <i>Lu. (N.) olmeca bicolor</i> , <i>Lu. (Ps.) panamensis</i> , <i>Lu. (V.) spinicrassa</i>	Northern South America, Venezuela
	<i>L. infantum</i> (syn. of <i>L. chagasi</i>)	OW, NW	VL, CL	X	X			<i>P. (Pa.) alexandri</i> , <i>Lu. (Lu.) almerioi</i> *, <i>P. (La.) ariasi</i> *, <i>L. (Lu.) atunesi</i> , <i>P. (Ad.) balcanicus</i> *, <i>P. (Ad.) brevis</i> , <i>P. (Ad.) chinensis</i> *, <i>Lu. (Lu.) cruzi</i> *, <i>Lu. (Pf.) evansi</i> *, <i>Lu. (Lu.) forattinii</i> , <i>P. (Ad.) halepensis</i> , <i>P. (La.) kandlakii</i> *, <i>P. (Ad.) Kyreniaiae</i> , <i>P. (La.) langeroni</i> *, <i>P. (La.) longicuspis</i> , <i>P. (Ad.) longiductus</i> *, <i>Lu. (Lu.) longipalpis</i> *, <i>P. (La.) major s.l.</i> *, <i>Lu. (Lu.) migonei</i> , <i>Lu. (N.) olmeca olmeca</i> , <i>Lu. (V.) ovallesi</i> , <i>P. (La.) perfilewii s.l.</i> *, <i>P. (La.) perniciosus</i> *, <i>Lu. (Lu.) pseudolongipalpis</i> , <i>Lu. (Lu.) sallesi</i> , <i>P. (Ad.) simici</i> , <i>P. (Ad.) sichuanensis</i> *, <i>P. (La.) smimovi</i> *, <i>P. (La.) tobbi</i> *, <i>P. (Ad.) turanicus</i> *, <i>P. (La.) wui</i> *	North Africa, Mediterranean countries (Europe and North Africa), Southeast Europe, Middle East, Central Asia, North, Central and South America (Brazil, Venezuela, Bolivia, Mexico)
VIANNIA (growth in the hindgut of sandfly)	<i>L. braziliensis</i>	NW	CL, MCL	X	X			<i>Lu. (N.) anduzei</i> , <i>Lu. (Psy.) ayrozai</i> , <i>Lu. (Ps.) carrerei</i> *, <i>Lu. (V.) columbiana</i> , <i>Lu. (Ps.) complexa</i> *, <i>Lu. (Lu.) cruciata</i> , <i>Lu. (Lu.) edwardsi</i> , <i>Lu. (Pi.) fischeri</i> *, <i>Lu. (Lu.) gomezi</i> *, <i>Lu. (N.) intermedia</i> , <i>Lu. (Lu.) lichi</i> , <i>Lu. (Ps.) llanosmartinsi</i> *, <i>Lu. (Lu.) longipalpis</i> , <i>Lu. (Lu.) migonei</i> *, <i>Lu. (N.) neivai</i> *, <i>Lu. (Lu.) nuneztovari anglesi</i> *, <i>Lu. (V.) ovallesi</i> *, <i>Lu. (Psy.) panamensis</i> *, <i>Lu. (Psy.) paraensis</i> , <i>Lu. (V.) pescei</i> , <i>Lu. (Lu.) pessoai</i> , <i>Lu. (V.) pia</i> , <i>Lu. (X.) shawi</i> *, <i>Lu. (V.) spinicrassa</i> *, <i>Lu. (Psy.) squamiventris</i> , <i>Lu. (Hel.) tejada</i> , <i>Lu. (Lu.) townsendi</i> , <i>Lu. (Lu.) trinidadensis</i> , <i>Lu. (N.) trapidoi</i> , <i>Lu. (N.) umbratilii</i> , <i>Lu. (N.) whitmani</i> *, <i>Lu. (Ps.) wellcomei</i> *, <i>Lu. (N.) ylephiletor</i> *, <i>Lu. (Lu.) youngi</i> , <i>Lu. (Psy.) yucumensis</i> *	Western Amazon basin, South America, Brazil, Bolivia, Peru Guatemala, Venezuela
	<i>L. peruviana</i>	NW	CL, MCL	X	X			<i>Lu. (Hel.) ayacuchensis</i> *, <i>Lu. (Hel.) noguchii</i> , <i>Lu. (Hel.) peruvensis</i> *, <i>Lu. (Hel.) tejada</i> , <i>Lu. (V.) verrucarum</i> *	Peru, Bolivia
	<i>L. guyanensis</i>	NW	CL, MCL	X	X			<i>Lu. (N.) anduzei</i> *, <i>Lu. (Hel.) ayacuchensis</i> *, <i>Lu. (N.) flaviscutellata</i> , <i>Lu. (V.) longiflocosa</i> , <i>Lu. (Psy.) llanosmartinsi</i> , <i>Lu. (Lu.) migonei</i> , <i>Lu. (V.) ovallesi</i> , <i>Lu. (N.) shawi</i> *, <i>Lu. (N.) umbratilii</i> *, <i>Lu. (N.) whitmani</i> *	Northern South America, Bolivia, Brazil, French Guiana, Suriname
	<i>L. panamensis</i>	NW	CL, MCL	X	X			<i>Lu. (T.) cruciata</i> , <i>Lu. (N.) flaviscutellata</i> , <i>Lu. (Lu.) gomezi</i> *, <i>Lu. (Hel.) hartmanni</i> *, <i>Lu. (Mig.) migonei</i> , <i>Lu. (V.) ovallesi</i> , <i>Lu. (Psy.) panamensis</i> *, <i>Lu. (Hel.) sanguinaria</i> , <i>Lu. (V.) spinicrassa</i> , <i>Lu. (N.) trapidoi</i> *, <i>Lu. (N.) umbratilii</i> , <i>Lu. (N.) ylephiletor</i> , <i>Lu. (N.) yuilli</i> *	Central and South America, Brazil, Panama, Venezuela, Colombia
	<i>L. shawi</i>	NW	CL	X	X			<i>Lu. (N.) whitmani</i> *	Brazil

\...

		<i>L. lainsoni</i>	NW	CL	X	X	<i>Lu. (V.) nuneztovari anglesi*</i> , <i>Lu. (N.) olmeca bicolor</i> , <i>Lu. (T.)</i> <i>ubiquitalis*</i> , <i>Lu. (N.) whitmani</i>
		<i>L. naiffi</i>	NW	CL	X	X	<i>Lu. (Psy.) amazonensis</i> , <i>Lu.</i> <i>(Ps.) ayrozai*</i> , <i>Lu. (Lu.)</i> <i>gomezi</i> , <i>Lu. (Psy.) paraensis</i> , <i>Lu. (Ps.) squamiventris*</i> , <i>Lu.</i> <i>(N.) trapidoi</i>
		<i>L. lindenbergi</i>	NW	CL	X	X	<i>L. (Lu.) atunesi</i>
UNCLEAR	L. enrietti complex	<i>L.</i>	NW, OW	CL, VL	X	X	Unknown
		<i>martiniquensis</i>					
		" <i>L. siamensis</i> "	OW, NW	VL, CL	X	X	<i>S. (Ne.) gemmea</i>
	PARALEISHMANIA	<i>L. colombiensis</i>	NW	CL, VL	X	X	<i>Lu. (Lu.) gomezi</i> , <i>Lu. (Hel.)</i> <i>hartmanni*</i> , <i>Lu. (Psy.)</i> <i>Panamensis</i>

Tabla 3. Especies de *Leishmania* encontradas en el ser humano en el NM: forma clínica, reservorios y vectores probados o sospechosos (adaptado de Akhoundi et al., 2016)

*: Vector probado, Ad.: *Adlerius*, C.: *Coromyia*, Eu.: *Euphlebotomus*, Hel.: *Helcocyrtomyia*, L.: *Leishmania*, La.: *Larrousius*, Lu.: *Lutzomyia*, Mig.: *Migonei*, N.: *Nyssomyia*, Ne.: *Neophlebotomus*, P.: *Phlebotomus*, Pa.: *Paraphlebotomus*, Pf.: *Pifanomyia*, Pi: *Pintomyia*, Ps.: *Psathyromyia*, Psy.: *Psychodopygus*, Si.: *Sintonius*, Sy.: *Synphlebotomus*, T.: *Tricholateralis*, V.: *Verrucarum* (en gris flebotomos del VM)

Dichas especies dan lugar a cuadros de LCL, LCD, LM y/o LV (**Figura 8**).

A estas especies, hay que añadir a *L. major*, causante de LC en el VM, que ha sido citada en algunos países de América del Sur, donde en un inicio se la nominó como "*L. major-like*" (Momen et al., 1985; Viana de Almeida et al., 2021).



Figura 8. Cuadros clínicos de leishmaniosis tegumentaria en las Américas y especies responsables (tomado de OPS-OMS, 2018).

Complejo *Leishmania (Viannia) braziliensis*

El complejo *L. (V) braziliensis* se compone de dos especies, *L. braziliensis* y *L. peruviana* que son genéticamente similares (Fraga, et al., 2010). Algunos investigadores reportan a *L. peruviana* como una variante de *L. braziliensis* (Grimaldi et al., 1989), mientras que otros las consideran dos especies distintas (Arana et al., 1990; Chouicha et al., 1997; Valdivia et al., 2015; Van den Broeck et al., 2020; Van der Auwera & Dujardin, 2015). Sin embargo, se sabe que *L. braziliensis* es el predecesor de *L. peruviana*, que evolucionó en adaptación a los diferentes ecosistemas del Perú (Dujardin et al., 1995), generándose incluso híbridos de *L. braziliensis/L. peruviana*, los cuales son capaces de producir LM (Kato et al., 2019; Ministerio de Salud del Perú, 2021; Nolder et al., 2007; Odiwuor et al., 2012).

Por otra parte, diversos estudios muestran un tercer grupo del complejo, que se diferencia genéticamente de *L. braziliensis* y *L. peruviana*, denominado *L. braziliensis* outlier o atípico (Odiwuor et al., 2012; Van der Auwera et al., 2013), que ha sido reportado en Perú, Panamá y

Bolivia (Fraga et al., 2013; Odiwuor et al., 2012). Incluso han sido reportados posibles híbridos de *L. braziliensis*/*L. braziliensis* outlier (Van der Auwera & Dujardin, 2015).

L. braziliensis, es causante de LM, la más grave entre las presentaciones cutáneas, ya que con mayor frecuencia es capaz de producir cuadros de LMC después de haberse curado la lesión inicial, en relación a *L. peruviana* (Montalvo et al., 2008; Van der Auwera & Dujardin, 2015). Aunque esporádicamente, la presencia de *L. peruviana* puede dar lugar también a LM (Mann et al., 2021; OPS/OMS, 2019; Reithinger et al., 2007).

Complejo Leishmania (Viannia) guyanensis

Las especies que conforman el complejo *L. guyanensis* son tres: *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. shawi* (Van der Auwera & Dujardin, 2015). *L. guyanensis* y *L. panamensis* forman subgrupos monofiléticos y algunos estudios no indican una separación clara de estas dos especies (Bañuls & Tibayrenc, 1999) al contrario de otros (Arana et al., 1990; Fraga et al., 2010). También se cuestiona la separación de *L. panamensis* y *L. shawi*, existiendo la teoría de que pueden ser variantes locales de *L. guyanensis* (Van der Auwera & Dujardin, 2015), mientras que otros estudios abogan por la validez de *L. shawi* como especie, que surgiría de un ancestro común compartido con *L. guyanensis* y *L. panamensis* (Kaufer et al., 2019).

También se ha evidenciado la presencia de LCM producidas por *L. panamensis* y, más raramente, por *L. guyanensis* (OPS/OMS, 2019). También pueden presentarse lesiones nodulares con linfangitis causadas frecuentemente por estas especies (Mokni, 2019).

Leishmania (Viannia) lainsoni* y *Leishmania (Viannia) naiffi

L. lainsoni presenta las características biológicas (morfología, crecimiento en medio de cultivo axénico), bioquímicas (perfil de electroforesis enzimática) y moleculares más diferenciadas dentro del subgénero *L. (Viannia)* (Fraga et al., 2010). *L. naiffi*, sería la segunda especie más divergente dentro de la especies del subgénero *Viannia* (Boité et al., 2012).

L. lainsoni y *L. naiffi* son las especies del género *Leishmania* menos estudiadas en el NM (Ducharme et al., 2020).

L. lainsoni es causante de LC, presentándose como una única úlcera en Brasil, Bolivia (zonas subtropicales), Guayana francesa y Perú (zonas tropicales). Los vectores son *Lu. ubiquitalis* en

Brasil y Perú, y *Lu. nuneztovari anglesi* en Bolivia. En Brasil el reservorio es *Agouti paca* (Akhoundi et al., 2016; OMS, 2010).

L. naiffi fue descrita a partir de un armadillo en Brasil. Los pocos casos descritos en la literatura suelen asociar a *L. naiffi* con bajas tasas de virulencia en humanos (Fagundes-Silva et al., 2015). Así, se ha descrito que la enfermedad evoluciona con un curso clínico benigno, incluso con curación espontánea, y con buena respuesta al tratamiento (Naiff et al., 1988; van der Snoek et al., 2009).

En los casos de LC causada por ambas especies, las lesiones son principalmente úlceradas en un 80% y nodulares en ciertas ocasiones, presentes en las áreas descubiertas del cuerpo. *L. lainsoni* parece ser responsable de múltiples lesiones a diferencia de la infección por *L. naiffi* que suele presentar lesiones únicas con curso clínico, comprometiendo exclusivamente las extremidades (Ducharme et al., 2020).

Leishmania (Viannia) lindenbergi

L. lindenbergi se ubica próxima a *L. guyanensis* (Boité et al., 2012). Esta especie ha sido aislada principalmente de soldados en el norte de Brasil, causando LCL, donde se ha citado a *Lutzomyia (Nyssomyia) anntunesi* como posible vector, por ser el más abundante en la zona (Silveira et al., 2002).

Complejo *Leishmania (Leishmania) mexicana*

El complejo *L. mexicana* comprende dos especies: *L. mexicana* y *L. amazonensis*, aunque según algunos estudios, *L. mexicana* sería la única especie reconocida (Fraga et al., 2010). Sin embargo, según estudios realizados por otros autores, se trata de dos especies válidas dentro del complejo (Tsukayama et al., 2009). Existen pocos estudios completos sobre la variabilidad genética y geográfica de este complejo (Van der Auwera & Dujardin, 2015).

L. mexicana fue descrita en México y es causante de LC, aunque en ocasiones también se ha aislado de LCD y LM (Andrade-Narvaez et al., 2005). Los primeros casos descritos eran lesiones ulceradas localizadas en el pabellón auricular, denominándose “úlceras de los chicleros” por cuanto las personas afectadas trabajaban extrayendo chicle de árboles chicleros (Vargas Martínez et al., 2011). Las lesiones causadas por *L. mexicana* suelen curarse espontáneamente en 3 a 4 meses (OMS, 2010).

L. amazonensis se encuentra distribuida en Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana Francesa y Paraguay, siendo su principal vector *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* y también ha sido aislada de *Lu. nuneztovari* in Bolivia (Akhoundi et al., 2016). Esta especie causa principalmente LC en los humanos, aunque también se han descrito casos de LMC, así como se han reportado casos aislados de LV por *L. amazonensis* en Brasil (Lainson, 2010).

Ambas especies pueden dar lugar a cuadro de LCD, con presencia de múltiples pápulas y nódulos no dolorosos, no ulcerosos y diseminados, semejante a la lepra lepromatosa (Burza et al., 2018).

Complejo Leishmania (Leishmania) donovani

Se han incluido cuatro especies en este complejo, *L. donovani*, *L. archibaldi*, *L. infantum* y *L. chagasi* (Fraga et al., 2010). Sin embargo, hoy en día se reconoce la sinonimia entre *L. infantum* y *L. chagasi* (Akhoundi et al., 2016).

Existen dos hipótesis acerca del origen de *L. infantum*. Algunos autores consideran que está confirmado que *L. infantum* ha sido recientemente importada al NM desde el suroeste de Europa (Kuhls et al., 2013), mientras que otros sugieren que el antecesor del complejo *L. donovani* diverge de otras especies monoxenas de *Leishmania* de insectos en América del Sur que, posteriormente, llegaron a Asia Central y de ahí divergieron a *L. infantum* europea, *L. donovani* africana y *L. donovani* India/keniana. *L. infantum* fue introducida posteriormente en América del Sur por colonos europeos (Lukeš et al., 2007).

L. infantum puede ocasionar tanto LV como LC. En el NM es el agente causal de la LV, que se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, donde se transmite entre los animales silvestres por *Lutzomyia longipalpis* (OMS, 2010). Su prevalencia es alta en zorros nativos *Cerdocyon thous* en Brasil y en la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) en Colombia (Lainson, 2010). Se ha encontrado en perros en todos los países de América latina, excepto en Chile, Uruguay, Surinam y Guyana (Dantas-Torres, 2009).

Excepcionalmente, se puede presentar una complicación de la LV, la LC post-kala-azar, provocando lesiones cutáneas que suelen presentarse como pequeños nódulos o ulceraciones y que han sido citadas en Colombia, Costa Rica y El Salvador. La leishmaniosis cutánea por *L. infantum* se observa principalmente en Centroamérica (Colombia, Costa Rica, El Salvador, Honduras y Nicaragua), y las lesiones consisten en nódulos o placas localizados similares a las lesiones causadas por las especies dermatropas del NM (OMS, 2010).

Otros tripanosomátidos

Actualmente, existen otros tripanosomátidos presentes en las Américas relacionados con la leishmaniosis humana entre las que se encuentran *L. colombiensis*, *L. "siamensis"* y *L. martiniquensis*.(Espinosa et al., 2018).

L. "siamensis" se ha detectado en un paciente procedente de Guadalupe que presentaba un cuadro de LV (Polley et al., 2018) y en flebotomos de Ecuador (Quiroga et al., 2017).

L. colombiensis se ha encontrado en perros, en casos humanos de LV en Venezuela y de LC en Colombia y Panamá (Dantas-Torres, 2009; Delgado et al., 1993; Kreutzer et al., 1991).

L. martiniquensis ha sido aislada de LC en caballos en Brasil (Mendes et al., 2023).

1.3 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS LEISHAMANIOSIS

1.3.1 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

En la LT, el diagnóstico se basa principalmente en la demostración del parásito, en muestras biológicas, por métodos parasitológicos, como el examen microscópico directo y/o el cultivo, así como pruebas moleculares (Aronson et al., 2017; De Vries et al., 2015). La sensibilidad de estos métodos varía en función de la experiencia del analista, sitio de toma de muestra (Figura 9), método de toma y procesamiento de la muestra, especies del parásito, tiempo de evolución de la lesión y uso de tratamientos previos (OPS/OMS, 2019).

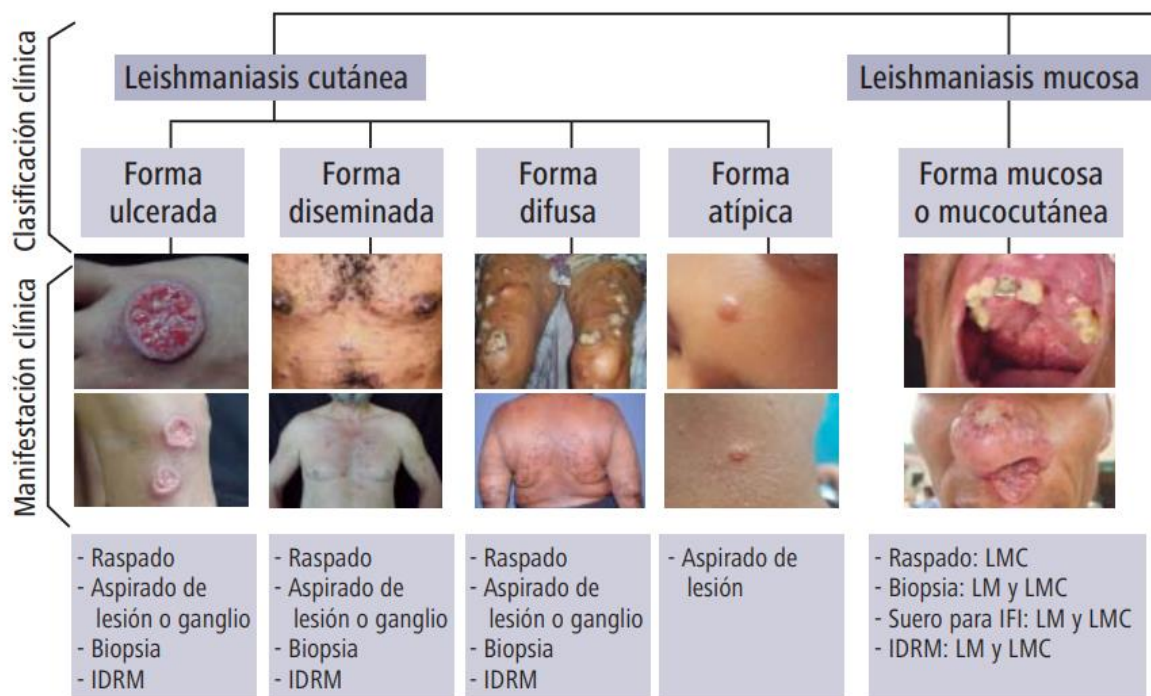


Figura 9. Toma de muestras para el diagnóstico de las leishmaniasis en las Américas (modificado de OPS/OMS, 2019).

Los métodos de cultivos son utilizados en el diagnóstico de la leishmaniasis en los laboratorio de salud que cuentan con infraestructura requerida, y su sensibilidad depende del medio de cultivo utilizado, del tratamiento de las lesiones previo a la toma de muestras y la experiencia del personal de laboratorio (Cuba Cuba, 2000). Su uso en la rutina de los servicios de salud es limitado, pero es importante que dichos cultivos estén disponibles en laboratorios de referencia (OPS/OMS, 2019). Existen diferentes medios de cultivos para el diagnóstico de las leishmaniasis, siendo los más utilizados el medio de cultivo bifásico Novy, Nicolle y McNeal (NNN), con 15% de sangre de conejo desfibrinada, y el medio líquido Schneider's Drosophila medium, suplementados con 10% de suero bovino fetal (Schuster & Sullivan, 2002). La sensibilidad de la técnica de cultivo es variable, requiere de tiempo y es de mayor costo (Reithinger et al., 2007).

Recientemente, se han desarrollado las técnicas de microcultivo y minicultivo para el diagnóstico de la LC, utilizándose diferentes medios de cultivo como el RPMI 1640 y Schneider (Allahverdiyev et al., 2004; Boggild et al., 2007; De Vries & Schallig, 2022; Pagheh et al., 2014). Estas técnicas son menos costosas al requerir de menos medio de cultivo; sin embargo, su utilización no se ha extendido a los servicios de salud (Montalvo et al., 2012).

1.3.2 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Es un método de gran importancia para el diagnóstico diferencial de las lesiones cutáneas que se manifiestan con presentaciones inusuales o que son causadas por otras etiologías, pero es una prueba poco sensible, probablemente por la distorsión que sufren los amastigotes durante el proceso de fijación y tinción, y por la dificultad que implica reconocer los parásitos en cortes histopatológicos (OPS/OMS, 2019).

1.3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Las pruebas de laboratorio basadas en la detección de ADN parasitario son más sensibles para el diagnóstico de las leishmaniosis y son especialmente recomendadas si las otras pruebas de diagnóstico no son capaces de diagnosticarla (Aronson et al., 2017). Además, permiten obtener resultados con muestras menos invasivas (De Vries & Schallig, 2022). La PCR permite detectar el ADN parasitario en una biopsia en cantidades mínimas (fentogramos) hasta de un solo parásito, pero, a pesar de ser más sensible y específica, está restringido al tercer nivel de cuidados hospitalarios, laboratorios de investigación y centros de referencia (Montalvo et al., 2012). La elevada sensibilidad hace que sea útil en casos con baja carga parasitaria o en el monitoreo de la terapia de pacientes (Reithinger et al., 2007). La PCR puede realizarse a partir de raspado, hisopado aspirado o biopsia de la lesión (Goto & Lauletta Lindoso, 2010; Mann et al., 2021). Los productos amplificados pueden ser visualizados en gel de agarosa por hibridación con sondas específicas (PCR convencional), o por detección de fluorescencia (PCR en tiempo real o qPCR) (OPS/OMS, 2019). La qPCR permitiría monitorear la respuesta al tratamiento en pacientes con LC e incluso podría utilizarse para predecir fallas en el tratamiento (De Vries & Schallig, 2022) (de Vries et al., 2022).

Las dianas moleculares incluyen las secuencias ribosómicas (gen 18S rRNA, ITS1 loci, ITS2 loci), la proteína de choque térmico 70 (hsp70) y el ADNk (Mathison & Bradley, 2022). La prueba qPCR, usando como blanco el ADNk, es muy sensible y precisa en la detección y cuantificación de *Leishmania* (*Viannia*) spp. en muestras de biopsia, por lo que constituiría una herramienta útil en el diagnóstico y seguimiento de LT en las Américas (Jara et al., 2013). Un inconveniente, es que no existen protocolos generales definidos y aceptados, ya que casi todos los laboratorios aplican su propio método interno o técnica “in house” (Moreira et al., 2018).

Recientemente, han sido desarrollados métodos de diagnóstico molecular basados en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmica, como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Sánchez et al., 2014), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y la amplificación de polimerasa recombinasa (RPA) (Nzelu et al., 2019), que presentan mejores ventajas que la PCR convencional, al poder ser utilizadas en laboratorios de baja infraestructura y en condiciones de campo (Takagi et al., 2009).

La LAMP, emplea una ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*), que tiene actividad polimerasa y transcriptasa inversa, y un conjunto de cuatro cebadores que reconocen a seis secuencias distintas del ADN diana, lo que las hace altamente específicas (Nzelu et al., 2019). Presenta 100% de sensibilidad y 98% de especificidad cuando se utiliza la LAMP en el diagnóstico de infección por *Leishmania* (Puri et al., 2021).

1.3.4 DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

En la leishmaniosis, el diagnóstico indirecto o inmunológico se puede realizar por el método de hipersensibilidad de tipo retardado anti-*Leishmania* (prueba de Montenegro o Leishmanina) y por ensayos de detección de anticuerpos anti-*Leishmania* (Goto & Lauletta Lindoso, 2010).

1.3.5.1 Prueba de Montenegro o Leishmanina

La prueba cutánea de Montenegro (IDRM) es la prueba de hipersensibilidad retardada que evalúa la reacción de la exposición del paciente a antígenos homólogos o heterólogos de promastigotes de *Leishmania* (leishmanina). La leishmanina, se aplica generalmente en el antebrazo izquierdo del paciente. Se utiliza principalmente como herramienta de apoyo en el diagnóstico de las LC y en estudios epidemiológicos para evaluar si hubo contacto previo con el parásito (OPS/OMS, 2019), sin embargo en el manual de procedimientos de la OPS del 2023, la IDRM ya no está contemplada como técnica de diagnóstico de laboratorio (OPS/OMS, 2023). Aunque es una prueba muy sensible y específica, siendo positivo en más del 90% de los casos de LC, no permite discriminar entre infección previa o reciente (Reithinger et al., 2007). En la LCD la reacción es siempre negativa (OPS/OMS, 2019).

1.3.4.2 Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas, si bien son muy utilizadas en el diagnóstico de la LV, no son muy útiles en los casos de LC, debido a su baja sensibilidad y a su especificidad variable, pero pueden ser útiles en el diagnóstico de LM y LMC cuando hay manifestaciones clínicas compatibles con la definición de caso sospechoso (Aronson et al., 2017).

1.4 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPECIES DE *LEISHMANIA*

La identificación de la especie de *Leishmania* es fundamental para un diagnóstico eficaz, un tratamiento exitoso, el manejo de la enfermedad y el establecimiento de medidas de control (Aronson et al., 2017; Kaufer et al., 2020; OMS, 2010; Schonian et al., 2011; Van der Auwera & Dujardin, 2015). Para la identificación de las especies de *Leishmania*, han sido aplicadas técnicas bioquímicas, como la electroforesis de isoenzimas (MLEE) y el isoelectroenfoque; técnicas moleculares, como la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), la técnica de PCR-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), PCR-secuenciación, la tipificación multilocus de secuencias (MLST) o la tipificación multilocus de microsatélites (MLMT), y técnicas proteómicas como la espectrometría de masas conocida como desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (Akhoundi et al., 2017; Arana et al., 1990; Fernández-Arévalo et al., 2020; Van der auwera et al., 2013; Van der Auwera et al., 2014).

1.4.1 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS BIOQUÍMICAS: ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS (MLEE)

La técnica MLEE se basa en el análisis de proteínas enzimáticamente activas denominadas isoenzimas (isozimas) que representan alelos (aloenzimas) que son codificadas en el mismo locus (genenzima). En *Leishmania*, la genenzima suele generar una única isoenzima (Rioux et al., 1990). Las isoenzimas son producidas por múltiples genes y son importantes para los procesos metabólicos en varios compartimentos celulares, por lo que, usando un conjunto definido de isoenzimas, se puede establecer un "patrón de movilidad" característico específico de especie o cepa (Akhoundi et al., 2017). La identificación por análisis isoenzimático, se realiza con extractos de proteínas a partir de cultivos puros de promastigotes. Las proteínas se separan en forma de

electromorfos, previa electroforesis en gel de almidón, gel de poliacrilamida o acetato de celulosa a bajos voltajes y tiempos de migración prolongados. Se utilizan un número variable de isoenzimas, habitualmente entre 10 y 15, seleccionando primero un sistema de enzimas estables (enzimas estructurales, que tienen baja sensibilidad a las presiones de selección) y, seguidamente, otro para seleccionar sistemas polimórficos no redundantes y, si fuera posible, que tenga una relevancia filogenética (Maazoun et al., 1981; Rioux et al., 1990). Su eficiencia se basa en el número de sistemas enzimáticos analizados y en su reproducibilidad en diferentes centros (Aronson & Joya, 2019; OMS, 2010). Esta técnica es capaz de detectar hibridaciones en cepas de *Leishmania* (Bañuls et al., 1997).

El análisis electroforético de isoenzimas, fue desarrollada a fines de la década de los 1970 y, en el campo del estudio de las leishmanias, el equipo del entonces denominado Laboratoire d'Écologie Médicale et Parasitologie de la Facultad de Medicina de la Universidad de Montpellier, estableció el sistema de zimodema MON, asignando a cada perfil enzimático de todas las cepas que muestran exactamente los mismos perfiles para todos los sistemas enzimáticos estudiados un código numérico (Akhoundi et al., 2016; A Bañuls et al., 2007; Rioux et al., 1990). Este equipo desarrolló uno de los estudios pioneros de la caracterización de *Leishmania* en el NM por MLEE (Thomaz-Soccol et al., 1993).

La MLEE, es considerado la técnica de referencia, pese a ser laborioso y requerir parásitos cultivados, tener un costo elevado, ser complejo y de difícil implementación en los centros convencionales (Akhoundi et al., 2017). Una de las ventajas del MLEE es que es la única técnica que se ha evaluado para casi todas las especies de *Leishmania* identificadas dado que ha sido la prueba de referencia durante mucho tiempo (Van der Auwera & Dujardin, 2015).

1.4.2 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

1.4.2.1 Técnicas de identificación molecular

Las técnicas de identificación molecular son rápidas y fiables, por lo que podrían sustituir a la MLEE (OMS, 2010). Dado que la PCR permite una amplificación específica masiva del ADN de *Leishmania*, tienen la ventaja de, “a priori”, poder ser aplicadas directamente a muestras

biológicas, evitando el cultivo del parásito. La técnica utiliza una PCR genérica que amplifica cualquier especie de *Leishmania* o una PCR específica que amplifica una o varias especies, complejos de especies o subgéneros (Van der Auwera & Dujardin, 2015). La identificación y diferenciación de especies de *Leishmania* puede realizarse por diferentes protocolos técnicos y los fragmentos de ADN amplificados de las muestras se examinan por electroforesis en busca de diferencias de longitud, variación del sitio de restricción, cuando se utilizan enzimas de restricción, secuenciación o análisis de curvas de fusión de alta resolución (HRM). Su utilidad depende de la variabilidad de los iniciadores o genes diana utilizados (Akhoundi et al., 2017).

Entre las técnicas utilizadas en la caracterización de las leishmanias están:

La **PCR multiplex**, que se basa en la amplificación simultánea de varios genes diana de ADN diferentes, en varias reacciones de PCR separadas en un experimento, utilizando múltiples pares de cebadores dentro de una sola mezcla de PCR y produciendo amplicones de diferentes tamaños de regiones de ADN específicos (Akhavan et al., 2010).

La **PCR anidada**, que es una variante de la anterior, que utiliza dos juegos de cebadores, específicos de complejos o de especie, en dos corridas sucesivas. El primer conjunto de cebadores amplifica una región de ADN más extensa que contiene el segmento diana. El segundo conjunto de cebadores amplifica una región secundaria dentro del primer producto para amplificar la región específica. Esta técnica ha permitido identificar infecciones mixtas de hasta tres especies simultáneamente en reservorios roedores (Jorquera et al., 2005).

La **secuenciación de productos de PCR** se basa en la incorporación selectiva de desoxinucleótidos que terminan la cadena. La identificación basada en la PCR seguida de la secuenciación de un amplicón, es bastante fácil de estandarizar y se obtienen secuencias de calidad. La identificación de especie puede determinarse detectando polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o comparando la secuencia obtenida con las secuencias de referencia, que puede representarse en un dendrograma, (Van der Auwera & Dujardin, 2015). La rapidez en obtener resultados va disminuyendo con el tiempo, lo que, junto la disminución del costo de la técnica hace que sea ampliamente utilizada para la identificación de especies de *Leishmania* y estudios filogenéticos (Akhoundi et al., 2017; Cantacessi et al., 2015). La PCR seguida de la secuenciación del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70), ha permitido identificar especies dentro de complejo *L. donovani* (Fernández-Arévalo et al., 2020; Fraga et al., 2010); así

mismo la PCR seguida de la secuenciación del gen *hsp70*, apoya la evolución de *L. peruviana* de *L. braziliensis*, por cambios del ecosistema costero andino, provocando la degradación de la especie al estado de subespecie de *L. peruviana* (Odiwuor et al., 2012). Por otra parte, permite realizar estudios de polimorfismo dentro de diferentes complejos de *Leishmania* (Van der Auwera et al., 2013).

En la actualidad, la secuenciación de segunda generación (NGS), tiene la capacidad de secuenciar a gran escala, con gran versatilidad, desde genomas completos hasta paneles reducidos de genes, estudio de fusiones y perfiles de expresión génica por ARN (Jauk, 2019). La NGS, permite la secuenciación rápida de 100 o más genes diana, incluyéndose, además de los genes constitutivos, otros que tienen funciones biológicas importantes, como la virulencia, la resistencia a los medicamentos, etc., que probablemente mejoren el conocimiento profundo de la historia natural, la evolución y la genética de la población de *Leishmania* (Schonian et al., 2011).

EL **RFLP**, donde la diferenciación de especies de *Leishmania* se basa en la visualización de patrones de bandas que generan los productos de digestión con una o varias endonucleasas de digestión que son puestos en evidencia en gel de agarosa. Dado que el RFLP es una técnica simple que requiere una infraestructura de laboratorio mínima, está disponible en todos los laboratorios donde se puede realizar la PCR (Van der Auwera & Dujardin, 2015). El tamaño y cantidad de fragmentos depende de la cantidad y posición de corte de la enzima que se utiliza en la secuencia estudiada (Akhoundi et al., 2017); por ejemplo, con la endonucleasa de restricción *HaeIII* el patrón obtenido ha demostrado ser más útil para la diferenciación entre *Leishmania* (*Viannia*) de importancia médica (Schönian et al., 2003). Como la secuenciación, la PCR-RFLP es capaz de discriminar especies estrechamente relacionadas, sobre todo cuando se utilizan genes constitutivos, por lo que puede ser aplicable en investigación de brotes y estudios de la dispersión de las cepas en sus diferentes ciclos de transmisión; sin embargo, no están normalizadas entre laboratorios y los resultados no se correlacionan con MLEE (OMS, 2010).

La **RAPD**, basada en la amplificación del ADN por PCR, usando solo un cebador corto definido arbitrariamente, obteniéndose fragmentos de ADN de distinto tamaño en función de los lugares de unión de los iniciadores (Akhoundi et al., 2017). Puede utilizarse sola o junto con otras técnicas para la identificación y caracterización de especies de *Leishmania*, especialmente de *L. infantum* (Toledo et al., 2002). Es relativamente sencilla, rápida y no necesita información previa sobre la secuencia (Schonian et al., 2011). Su uso está restringido por requerir ADN de *Leishmania* de alta

pureza y la estandarización precisa de las condiciones de la PCR para garantizar la especificidad (Akhoundi et al., 2017; Schonian et al., 2011). Solo pueden aplicarse a parásitos cultivados axénicamente, ya que se basan en la amplificación de fragmentos de ADN aleatorios, por lo que, al trabajar con muestras, amplificarían principalmente el abundante ADN del hospedador y no específico de *Leishmania* (Van der Auwera & Dujardin, 2015).

El estudio de Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (**AFLP**) es una técnica que se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de un digerido de ADN genómico por PCR (Vos et al., 1995). Los fragmentos amplificados se separan y visualizan en geles de poliacrilamida, reportándose como presencia/ausencia de polimorfismos, con lo cual se ha demostrado su utilidad en la investigación de variabilidad genética de especies de *Leishmania* estrechamente relacionadas (Kumar et al., 2010). Con esta técnica se han identificado incluso híbridos naturales de *Leishmania aethiopica/Leishmania donovani* (Odiwuor et al., 2011). Una variante de esta técnica es la técnica código de barras de longitud de fragmento fluorescente (**FFLB**, Fluorescent fragment length análisis Barcoding), en la cual el análisis del tamaño de los fragmentos por fluorescencia se realiza en un secuenciador automático (Schonian et al., 2011).

El análisis de alta resolución de fusión (**PCR-HRM**) que suele ser una qPCR, es un método que se basa en la medición de la intensidad de fluorescencia del colorante de intercalación de ADN en el transcurso de la disociación del ADN mono o bicatenario y es capaz de discriminar especies de *Leishmania* del VM (Fayaz et al., 2021; Nasereddin & Jaffe, 2010) y NM (Hernández et al., 2014). Miden la tasa de disociación de la doble cadena del ADN a cadena sencilla con incrementos de temperatura y registrando los cambios en la fluorescencia correspondientes. La discriminación de especies de *Leishmania* se da en función de su composición, longitud, contenido de GC y complementariedad de cadenas (Akhoundi et al., 2017; Villarreal et al., 2021). La qPCR permite una identificación rápida de *Leishmania* a nivel de complejo, mostrando ser una herramienta molecular útil para estudios epidemiológicos y en diagnóstico clínico (Wortmann et al., 2005). Así mismo, permite la identificación de especies de *Leishmania* a través del análisis de las curvas de temperaturas de desnaturalización media de alta resolución, utilizando diferentes genes como la SSU rRNA (Mota et al., 2018).

La **MLST**, se basa en la comparación de secuencias parciales, de siete o más genes constitutivos, y es un método altamente estandarizado (Gow et al., 2022). Desde el punto de vista filogenético

es más poderoso y podría reemplazar a MLEE en el futuro (Schonian et al., 2011). MLST puede considerarse una versión mejorada de MLEE, en la que cada enzima se evalúa mediante el análisis de su secuencia de codificación, en lugar de basarse en una única evaluación de movilidad de gel. De este modo, también se grafican las variaciones que no afectan a esta movilidad (Van der Auwera & Dujardin, 2015). En MLST, cuatro genes constitutivos *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)*, *6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD)*, *manosa fosfato isomerasa (MPI)* e *isocitrato deshidrogenasa (ICD)*, son marcadores que han mostrado determinar las relaciones intra e inter-específicas y han contribuido a la filogenia de *L. (Viannia)* (Boité et al., 2012), e incluso han revelado distintos patrones entre cepas de *L. (V) braziliensis* (Marlow et al., 2014).

La **MLMT** tiene la capacidad de discriminar a nivel intraespecie. Se amplifican varias regiones de microsatélites en todo el genoma (Van der Auwera & Dujardin, 2015). Los microsatélites son regiones repetidas de di- o tri-nucleótidos cortos de 1–6 pb, que se repiten en tándem y que presentan una variación de longitud alélica que constituye un patrón de huella digital y debido a su gran homología deben analizar entre 10 a 20 marcadores (Schönian et al., 2008). Los marcadores son específicos de especie en *Leishmania*, por ello se debe usar diferentes conjuntos de marcadores con diferentes especies. MLMT tiene el mayor potencial para su uso en muestras clínicas sin necesidad de cultivo, porque es sensible y específico y su mejor reproducibilidad, fue considerado como candidato para convertirse en el estándar de oro para la distinción de cepas (Schonian et al., 2011; Van der Auwera & Dujardin, 2015). MLMT se ha utilizado en la investigación de brotes de leishmaniosis visceral causados por el complejo *L. donovani* y es capaz de identificar híbridos de *L. braziliensis/L. peruviana*; sin embargo, no es adecuado para inferir filogenia (Marlow et al., 2014; Nolder et al., 2007). También ha sido utilizado para demostrar la alta diversidad genética de *L. panamensis* (Ramírez et al., 2016).

1.4.2.2 Marcadores moleculares

Los métodos de caracterización deben de tener poder discriminatorio, ser versátiles, rentables y con capacidad para detectar y cuantificar *Leishmania* spp., además de ser sensibles, específicos, rápidos, precisos, accesibles, fáciles de utilizar y aplicar en el campo, aspectos que están relacionados con la elección de dianas o marcadores moleculares (Akhoundi et al., 2017). Las

dianas tienen característica específica de ser capaces de detectar género, complejo o especie y pueden tener secuencias conservadas o variables entre las especies de *Leishmania*. La correcta elección del blanco para el diseño de los cebadores influye en la sensibilidad y especificidad de la técnica (Conter et al., 2019). Existen numerosos **marcadores moleculares o dianas**, incluidos tanto en el ADN cromosómico como en el ADN no cromosómico, que han sido utilizadas para la detección y tipificación, entre ellos que se encuentran los siguientes:

a) DNA cromosómico

Dentro del ADN cromosómico, está el **gen del rRNA**, que está localizado principalmente en el cromosoma 27, generalmente como múltiples copias de repeticiones de cabeza a cola en tándem de aproximadamente 12,5 Kb. La unidad de transcripción de ARN ribosomal, **rRNA 18S** es un ARN estructural del SSU ribosomal, que por su alta conservación de este gen y sus regiones laterales son útiles para reconstrucción de relaciones filogenéticas (Akhoundi et al., 2017).

Los espaciadores transcritos internos (**ITS**) son fragmentos de ADN de ADN espaciador no codificante ubicados entre las unidades del ARNr. U. Las regiones ITS más variables son ideales para la tipificación de especies. La región ITS1, varía de 50 a 350 pb y se encuentra entre los genes 18S rRNA y 5.8S rRNA y la región **ITS2** tiene una longitud de 50-650 pb y se encuentra entre los genes 5.8S rRNA y LSU rRNA (Akhoundi et al., 2017; Schönian et al., 2003). ITS1 permite, por su polimorfismo, la tipificación de especies, como la diferenciación de *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis* entre las especies del NM (Cupolillo et al., 1995; Mauricio et al., 2004; Schönian et al., 2003). La amplificación de ITS2 con cebadores de PCR genéricos reveló diferencias entre *Leishmania* spp. del VM y del NM, pero también entre complejos de especies y especies de subgéneros (Kuhls et al., 2005; Schönian et al., 2003). ITS1 e ITS2, resultaron ser marcadores útiles para el diagnóstico e identificación de especies del subgénero *Leishmania* y *Viania* por secuenciación (De Almeida et al., 2011; Cupolillo et al., 1995).

Región espaciadora intergénica (**IGS**), elemento genómico que varía en tamaño, número y secuencia entre las especies de *Leishmania* y que contiene un elemento repetido de 60-64 pb de longitud de 16-275 copias, provocando variaciones de longitud de 4-12 Kbp (Orlando et al., 2002). Está menos conservado que los genes rRNA y, por lo tanto, es más adecuado para cartografiar las relaciones evolutivas entre especies de *Leishmania* estrechamente relacionadas.

El **Mini exón o SL RNA** (Spliced leader RNA), gen de cinetoplastidos protistas que están presentes en 100-200 copias repetidas en tándem en el genoma nuclear, ha sido utilizado en estudios de filogenética de *Leishmania* (Akhoundi et al., 2017). Este marcador fue utilizado en un solo ensayo multiplex, identificándose, tres complejos simultáneamente (*L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. donovani*) al generarse productos de diferentes tamaños para cada complejo, por lo que serían útiles cuando se encuentran diferentes complejos de *Leishmania* en la misma área geográfica (Harris et al., 1998).

Los genes que codifican proteínas, se encuentran en diversos cromosomas y son utilizados como marcadores para la identificación y discriminación de especies de *Leishmania*. La estructura de los cromosomas difiere inter- e intra-especies (Akhoundi et al., 2017).

Los **genes gp63**, se expresan en promastigotes y amastigotes, y sus productos participan en la adhesión del parásito a las células hospedadoras y la internalización en los macrófagos (Conter et al., 2019). La *gp63* está muy conservada en el género *Leishmania*, y está presente en varias copias en diferentes especies, presentando elevada sensibilidad de detección lo que permite su aplicación directamente en muestras clínicas (Yao et al., 2003; Van der Auwera & Dujardin, 2015). El *gp63*^{EXT} (clase del gen *gp63* extendido en extremo 3') es un excelente marcador para la filogenia y tipificación del complejo *L. donovani* (Mauricio et al., 2007). El locus del gen *gp63* fue utilizado también en la caracterización genética de especies del subgénero *Viania*, (*L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* y *L. lainsoni*) que, mediante *gp63*-RFLP, pudo evidenciarse un extenso polimorfismo y reveló marcadores específicos para subgéneros, especies y poblaciones geográficas, mostrando la plasticidad genómica de los genes *gp63* (Victoir et al., 1998).

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), fue utilizada con éxito para caracterización parcial del gen *g6pd* por PCR para discriminar especies de *Leishmania* responsables de LT de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* y distinguir la especie *L. braziliensis* de las otras especies de este subgénero (Castilho, et al., 2003). Así mismo, la *g6pd* forma parte del perfil de enzimas utilizadas en MLEE y análisis MLST para la identificación de especies de *Leishmania* (Boité et al., 2012; Chouicha et al., 1997).

Manosa fosfato isomerasa (MPI), forma parte del perfil de enzimas utilizadas en MLEE y análisis MLST (Akhoundi et al., 2017). Junto con el análisis de secuencias de la enzima isocitrato deshidrogenasa, enzima málica, G6PD y fumarato hidratasa, demuestra la variabilidad genética

del complejo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* y *L. archivaldi*) e, incluso, ha sido capaz de demostrar una fuerte correlación del genotipo con el origen geográfico (Zemanová et al., 2007). Por MLEE, la MPI es capaz de discriminar en forma clara *L. peruviana* de *L. braziliensis* (Arana et al., 1990). Por otro lado, el análisis filogenético de cuatro genes internos (G6PD, 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), MPI e isocitrato deshidrogenasa (ICD)) por MLSA, es capaz de determinar las relaciones intra- e inter-específicas y al análisis de la filogenia de *L. (Viannia)* (Boité et al., 2012).

Las proteínas de choque térmico o **Heat-shock proteins (HSPs)**, tienen un papel importante en el plegamiento de las proteínas, desde la síntesis inicial en los ribosomas hasta las etapas finales de plegamiento y degradación de otras proteínas (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Young et al., 2004). En el genoma de *Leishmania* están presentes 5 a 10 copias del gen, y se pueden dar diferencias menores entre ellas en una cepa particular (Van der Auwera & Dujardin, 2015). Los genes que codifican las proteínas *hsp70*, fueron de los primeros en ser utilizados en la caracterización de kinetoplastidos por ser altamente conservados y estar presentes en varias copias en tándem (Folgueira et al., 2007). Han sido útiles para estudios filogenéticos y taxonómicos de *Leishmania* tanto en el NM como en el VM (Conter et al., 2019; Odiwuor et al., 2012; Van der Auwera & Dujardin, 2015; Van der auwera et al., 2013) y han demostrado ser dianas adecuadas y sensibles para la tipificación de especies dentro de complejos del NM (Hoyos et al., 2022) a partir de cultivos axénicos, como también a partir de tejidos (Garcia et al., 2004).

La **Cysteine protease B (cpB)** forma parte de la familia de cisteínas peptidasas expresadas por cisteína peptidasa A, B y C (*cpa*, *cpb*, *cpc*) (Akhoundi et al., 2017). En el genoma de *Leishmania* están presentes varias copias del gen dispuestas en una matriz en tándem; las copias no son todas idénticas y se clasifican en varios subgrupos (Van der Auwera & Dujardin, 2015). El gen *cpB* ha demostrado su utilidad como blanco en la caracterización de especies del complejo *L. donovani* mediante PCR-RFLP en muestras de aspirado de médula ósea y sangre venosa obtenidas de pacientes con LV (Quispe Tintaya et al., 2004). Así mismo, la secuenciación de los productos amplificados del gen *cpB* por PCR, ha permitido realizar el análisis filogenético del complejo *L. donovani* (Chaouch et al., 2013).

b) ADN no cromosómico

Todos los kinetopláستidos, incluyen **ADNk** que consta de varios miles de moléculas de ADN unidas en una red concatenada. Los círculos de kDNA son de dos tipos, maxicírculos y minicírculos (Van der Auwera & Dujardin, 2015). Los maxicírculo suelen oscilar entre 20 y 40 kb, según la especie, y están presentes en unas pocas docenas de copias idénticas por red. Los minicírculos, presentes en varios miles de copias por red, suelen tener un tamaño casi idéntico (de 0,5 a 10 kb, según la especie), pero su secuencia es heterogénea (Lukeš et al., 2002). En *Leishmania* y otros tripanosomátidos, el kDNA está compuesto por miles de minicírculos (95% del kDNA) y unos pocos maxicírculo, catenados juntos en una red compleja. (Akhoundi et al., 2017; Camacho et al., 2019). El maxicírculo es utilizado en análisis filogenéticos para especies dentro de la familia de tripanosomátidos (Kaufer et al., 2019). *L. braziliensis* es la especie más divergente del género *Leishmania* en su genoma nuclear, pero el maxicírculo presenta una elevada conservación, lo que sugiere que el patrón de edición se conserva también en el subgénero *Viannia*, indicando una elevada conservación en la edición de los transcritos mitocondriales a nivel de género (Nocua et al., 2011). Por otro lado, los resultados del análisis de secuencias de minicírculos de kDNA de los aislamientos de *Leishmania* en la frontera iraní, y el diagnóstico de heterogeneidad genética, son importante para la detección de terapias, control y estudios epidemiológicos (Flaih et al., 2021).

La qPCR de kDNA, dirigida a la región conservada de los minicírculos, ha mostrado ser un método rápido y confiable para identificar los principales agentes etiológicos de las LC y LV en las regiones endémicas de Brasil (Pita-Pereira et al., 2012). Así mismo, ha mostrado un gran potencial de aplicación como herramienta de diagnóstico y seguimiento en la LT americana (Jara et al., 2013)

Otro de los marcadores utilizados, es el **citocromo oxidasa (CO) I, II y III**, que forman las tres subunidades del complejo enzimático terminal de la cadena respiratoria (Akhoundi et al., 2017). El gen COII menos conservado, ha permitido el estudio de la variación genética dentro del complejo *L. donovani* (Cao et al., 2011; Ibrahim & Barker, 2001).

1.4.3 IDENTIFICACIÓN POR TÉCNICAS PROTEÓMICAS: ESPECTROSCOMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

MALDI-TOF MS es una técnica proteómica que ha demostrado ser de gran utilidad para la identificación de microorganismos, incluidas bacterias, hongos y parásitos (Caballero & Martin, 2018; Franco-Álvarez de Luna, 2018; Maldonado et al., 2018; Zárata et al., 2014). Fue introducida por primera vez en 1987, recibiendo sus inventores el Premio Nobel en 2002 (Clark et al., 2013). Esta técnica es precisa y económica, proporciona información completa y es rápida y fácil manejo (Canal et al., 2014; García et al., 2012).

En la técnica, la muestra se mezcla con una matriz sobre una placa de metal conductor, después de la cristalización de la matriz y el material microbiano, la placa de metal se introduce en el espectrómetro de masas, donde se bombardea con breves pulsos de láser. Las moléculas desorbidas e ionizadas, se aceleran a través de un campo electrostático y se expulsan a través de un tubo de vuelo de metal sujeto al vacío hasta alcanzar un detector, los iones más pequeños viajan más rápido que los iones más grandes. Por lo tanto, los bioanalitos separados según su TOF crean un espectro de masas compuesto por picos de relación masa/carga (m/z) con intensidades variables. Un espectro es, por lo tanto, una firma microbiana que se compara con una base de datos para la identificación a nivel de especie o género (figura 10).

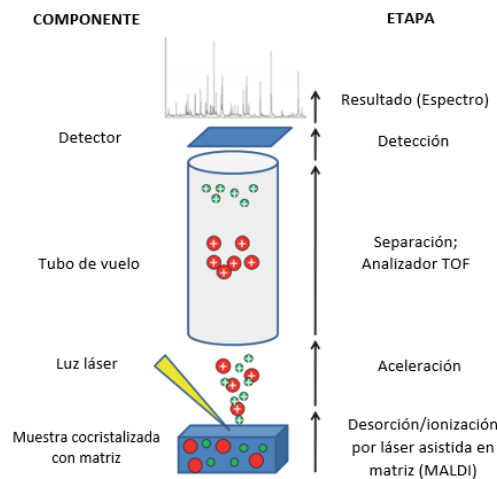


Figura 10. Descripción del fundamento de la técnica de la espectrometría de masas MALDI-TOF. (tomado de Croxatto et al., 2012).

Esta técnica proteómica, ahora está integrada en el trabajo de rutina de muchos laboratorios, simplificando enormemente la identificación de patógenos y mejorando la atención al paciente

(Seng et al., 2009). Varias plataformas comerciales y de acceso abierto bien establecidas basadas en MALDI-TOF MS, están disponibles para la identificación de bacterias y levaduras. La mayor parte de las bases de datos de espectros, se pueden personalizar agregando espectros para mejorar el poder discriminatorio de MALDI-TOF, incluso para la tipificación de cepas (Clark et al., 2013). En 2014, la técnica MALDI-TOF MS se aplicó por primera vez en la identificación de *Leishmania*, con la creación de una biblioteca a la que se puede acceder a través de una web de aplicación gratuita (Cassagne et al., 2014; Lachaud et al., 2017). La identificación de especies de *Leishmania* se realiza a través de la huella digital espectral de proteínas características que se generan a partir de cultivos de parásitos (Evers et al., 2018; Mouri et al., 2014). El MALDI-TOF por su sencillez, rapidez en la obtención de resultados y bajo coste, podría representar un método adecuado para la caracterización de *Leishmania* en países con acceso limitado a herramientas moleculares, pero donde la técnica ya está disponible en laboratorios de microbiología; a pesar de requerir cultivos, esta técnica, tiene las ventajas de velocidad y bajo coste, y podría integrarse en laboratorios clínicos (Aronson & Joya, 2019). Sin embargo, solo es adecuado para identificar leishmanias cultivadas, y los datos espectrales no son comparables entre diferentes laboratorios por lo que cada centro debe desarrollar su propia biblioteca validada de espectros de referencia (Van der Auwera & Dujardin, 2015) o bien puede realizarse a través del acceso a una web de gratuita aplicación (Lachaud et al., 2017).

1.5 CONTROL Y TRATAMIENTO DE LAS LEISHMANIOSIS

Las estrategias de prevención y control de la leishmaniosis, se centran principalmente en el tratamiento de la enfermedad y en aplicar medidas preventivas de protección personal, ya que las medidas de eliminación de reservorios o la reducción del contacto humano-vector, son costosas y laboriosas y porque la LC no es una enfermedad mortal (Aronson et al., 2017; OPS/OMS, 2019; Reithinger et al., 2007). Sin embargo, se ha visto conveniente integrar la vigilancia de vectores en áreas donde la leishmaniosis es coendémica con otras enfermedades transmitidas por vectores, como la malaria y el dengue, aprovechando el personal de salud que participa en la vigilancia de los flebotomos, pudiendo utilizarse para la vigilancia entomológica de otras enfermedades, con el fin de fortalecer y promover el concepto de vigilancia integrada de vectores (World Health Organization, 2022).

Si bien, el diagnóstico temprano y tratamiento adecuado de las personas afectadas, constituyen las estrategias de control de la leishmaniosis, las pocas opciones del tratamiento y la toxicidad de los medicamentos (OPS 2013; Reithinger et al., 2007), hacen que sea necesario tratar previamente la sobreinfección si existiera.(OMS, 2010).

Tras una cuidadosa evaluación diagnóstica en la que no se confirme ni leishmaniosis ni otro diagnóstico, y después de ser discutido con el paciente, puede estar indicado el tratamiento empírico en base a una valoración riesgo-beneficio individualizada y debe ser reevaluado periódicamente, teniendo en cuenta la evolución clínica (Aronson et al., 2017). Si, se ha confirmado la LT por el laboratorio, no es imperativo identificar la especie de *Leishmania*, si se conoce la especie más prevalente en la región. El tratamiento es instaurado según el estado clínico, la disponibilidad del fármaco y el balance riesgo-beneficio. Además, se debe recomendar al paciente sobre la higiene de las lesiones e informar sobre la falta de respuesta al tratamiento y la aparición de efectos secundarios de los fármacos durante su tratamiento (OPS/OMS, 2022a).

En la LC, el tratamiento reduce la morbilidad (prevención de recaídas y evitar la diseminación hacia las mucosas), aunque las lesiones pueden sanar sin terapia, y el tratamiento es recomendable en lesiones graves o cuando haya riesgo de enfermedad de la mucosa (Aronson & Joya, 2019). En el caso de LT, se recomienda el tratamiento sistémico para personas con LC compleja o en personas con LC en quienes no es práctico usar terapia local o si se prefiere una curación más rápida de lesiones grandes, estética o funcionalmente preocupantes o en aquellas que presente síndromes cutáneos menos comunes, como la LCD (causada por *L. mexicana* y *L. amazonensis*) y la LC diseminada (causada por *L. braziliensis*) (Aronson et al., 2017). Se recomienda aplicar antimoniales pentavalentes intralesionales en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada causada por *L. braziliensis* o *L. amazonensis* (OPS/OMS, 2022a).

Los medicamentos utilizados en el tratamiento de la LC y MC son los Antimoniales Pentavalentes (tratamiento de primera línea), como el Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) y el Estibogluconato de Sodio (Pentostam®), que son de administración intramuscular, y tiene una tasa de curación del 56,9 % en LC y 64,5% en LM (Cubas et al., 2019). Estos medicamentos no están aprobados por la FDA por su toxicidad (pueden provocar anorexia, vómitos, náuseas, dolor abdominal, malestar, mialgias, artralgias, cefaleas, sabor metálico y letargo (OMS, 2010). Otra alternativa es la Miltefosina (administración oral, aprobado por la FDA) para el tratamiento de la

LC causada por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*. (Aronson & Joya, 2019). El Desoxicolato de Anfotericina B (AmB-D), es un antibiótico poliénico, antifúngico de amplio espectro y activo contra especies de *Leishmania*, pero es tóxico (puede provocar fiebre elevada y escalofríos, miocarditis, nefrotoxicidad), por lo que su administración es hospitalaria con monitoreo continuo por su toxicidad) (OMS, 2010). Se han formulado otras formas farmacéuticas de la AmB-D para reducir su toxicidad, como la Anfotericina B liposomal (AmB-L-AmBisome®), aprobada por la FDA. La AmB-L-AmBisome®, se utiliza en la India como fármaco de primera línea para el tratamiento de la LV en pacientes que no responden al tratamiento a los Antimoniales Pentavalentes (Mendes et al., 2020). Por otra parte, el Fluconazol administrado por vía oral, no ha mostrado eficacia en áreas de alta transmisión por *L. braziliensis* (Prates et al., 2016).

La terapia local, se utiliza, generalmente, como terapia de primera línea en los casos de LC con lesiones únicas, tanto en el VM como en el NM (Aronson & Joya, 2019).

La termoterapia es utilizada como tratamiento alternativo en LC localizadas en Afganistán (Reithinger et al., 2007) y, en las Américas, es recomendada en mujeres embarazadas y en lactancia y en pacientes con alteraciones en el electrocardiograma. Por su parte, la terapia intralesional con Antimoniales Pentavalente es utilizada en mujeres en lactancia, enfermos renales, hepáticos y cardiacos.

La elección del medicamento a utilizar por el médico se realiza en base a la presentación clínica, número y localización de las lesiones, disponibilidad del fármaco, nivel de atención, etc., además el optar por tratamiento local o sistémico dependiendo de la salud del paciente (OPS/OMS, 2022a). En la **tabla 4**, se recogen las recomendaciones de la OPS para el tratamiento de la LT en adultos en las Américas.

LC

RECOMENDACIONES	
Leishmaniasis cutánea en pacientes adultos	
	Se recomienda aplicar antimoniales pentavalentes intralesionales en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada causada por <i>L. braziliensis</i> o <i>L. amazonensis</i> .
	Recomendación fuerte, certeza de la evidencia baja
	Se recomienda usar miltefosina en pacientes adultos con diagnóstico de leishmaniasis cutánea causada por <i>L. panamensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> o <i>L. braziliensis</i> .
	Recomendación fuerte, certeza de la evidencia baja
	Se sugiere administrar isetionato de pentamidina en pacientes con diagnóstico de leishmaniasis cutánea causada por <i>L. guyanensis</i> .
	Recomendación condicional, certeza de la evidencia baja
	Se sugiere aplicar termoterapia en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada causada por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> o <i>L. mexicana</i> .
	Recomendación condicional, certeza de la evidencia muy baja
	Se sugiere usar paromomicina en pacientes con leishmaniasis cutánea causada por <i>L. panamensis</i> , <i>L. braziliensis</i> o <i>L. mexicana</i> .
	Recomendación condicional, certeza de la evidencia muy baja
	Se sugiere utilizar antimoniales pentavalentes en pacientes adultos con diagnóstico de leishmaniasis cutánea causada por <i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. peruviana</i> o <i>L. mexicana</i> .
	Recomendación condicional, certeza de la evidencia de moderada a baja

LM

RECOMENDACIÓN	
	Se recomienda usar antimoniales pentavalentes con o sin pentoxifilina oral para tratar a los pacientes con leishmaniasis mucosa o mucocutánea.
	Recomendación fuerte, certeza de la evidencia baja y muy baja

Tabla 4. Recomendaciones de la OPS para el tratamiento de la LC en las Américas (tomado de OPS, 2022a).

1.5.1 FALLA TERAPÉUTICA Y RESISTENCIA

Como en otras enfermedades, se ha descrito falla terapéutica (FT) después de haber instaurado tratamiento para la leishmaniosis. Se pueden definir dos formas principales de FT: (1) por la falta de respuesta o la persistencia de los síntomas al final del tratamiento (después de seguimiento de 3 meses), y (2) la recaída o reactivación, con un segundo episodio después de la aparente curación inicial del paciente (los síntomas clínicos se verifican por medios parasitológicos, inmunológicos o moleculares) (OPS/OMS, 2019). La FT no debe ser considerada como sinónimos de resistencia a los medicamentos. Existen factores que juegan un papel importante en la FT como son: 1) los dependientes del hospedador, se requiere una respuesta inmunitaria eficaz para respaldar los medicamentos contra las leishmanias; 2) los dependientes del parásito (la virulencia inherente a la cepa infectante de *Leishmania* y/o infección del parásito por virus de ARN); 3) los relacionados con el medicamento (dosificación inapropiada por falta de experiencia del personal médico o la autoadministración, que conllevan al riesgo a seleccionar parásitos resistentes a esos medicamentos) (Ponte-Sucre et al., 2017).

La FT ha sido más analizada en los casos de LV, habiéndose demostrado que el tratamiento incompleto del kala-azar en la India con Antimoniales Pentavalentes, podría ser la causa de la falta de respuesta al tratamiento en los pacientes, y favorecer al parásito desarrollar tolerancia y resistencia al fármaco (Croft et al., 2006; Sundar et al., 1994). En las Américas, se ha descrito principalmente en casos de LM (Carvalho et al., 2022).

La resistencia a los Antimoniales Pentavalentes se ha generalizado en la India y su uso ha sido reemplazado; sin embargo, estos fármacos siguen siendo utilizados en América latina y en África oriental en el tratamiento de leishmaniosis (Ponte-Sucre et al., 2017). Así mismo se ha reportado una tasa de FT de hasta del 50% en tratamiento con SbV en LC causada por *L. braziliensis* (Prates et al., 2016).

La Anfotericina B, es el principal tratamiento de LV en zonas endémicas de Bihar, India, donde no hay respuesta al tratamiento con Gluconato de Antimonio y Sodio. Sin embargo, se ha mostrado la posibilidad de aparición de farmacoresistencia adquirida por el mecanismo de la alteración de la composición de la membrana celular y conferir resistencia a la Anfotericina B en aislados clínicos de *L. donovani* (Purkait et al., 2012).

En el Perú, la tasa de fracaso terapéutico al SbV fue 96 % dentro de los primeros 3 meses y 24,4% a los 6 meses de evaluación de seguimiento. Por especie de parásito, el fracaso terapéutico fue hasta el 7,4 % en la infección por *L. guyanensis*, 28,6% en la infección por *L. peruviana* y 31% en la infección por *L. braziliensis*, siendo similares a los 12 meses de seguimiento de evaluación (Arevalo et al., 2007; Llanos-Cuentas et al., 2008).

1.6 LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA

1.6.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA LEISHMANIOSIS EN BOLIVIA

Estado Plurinacional de Bolivia se encuentra entre los países con mayor número de casos de LM o LCM (281), después de Brasil (756), Perú (419), representando el 87% del total de casos de la Región de las Américas (OPS/OMS, 2022b). En Bolivia, la LT es endémica en siete de los nueve departamentos (Pando, Beni, La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Chuquisaca y Tarija) (Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia, 2015b), correspondiendo la mayor cantidad de casos reportados a los cuatro primeros departamentos indicados (Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia, 2016). En el periodo 1983 al 2014 se registraron, aproximadamente, 52.244 casos de leishmaniosis en sus diferentes formas clínicas, siendo más prevalente la LC, hasta un 92%, seguida de la LM (8%) y la LV (0,2%) (Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a). Los últimos datos, correspondientes al año 2021, indican una incidencia de 2.166 nuevos casos, de los cuales el 87% corresponde a LC y el 13% a LM, correspondiendo a 35,8 casos/100.00 habitantes, y considerándose que existe un alto riesgo de transmisión (**Figura 11**) (OPS/OMS, 2022b).

A)



B)

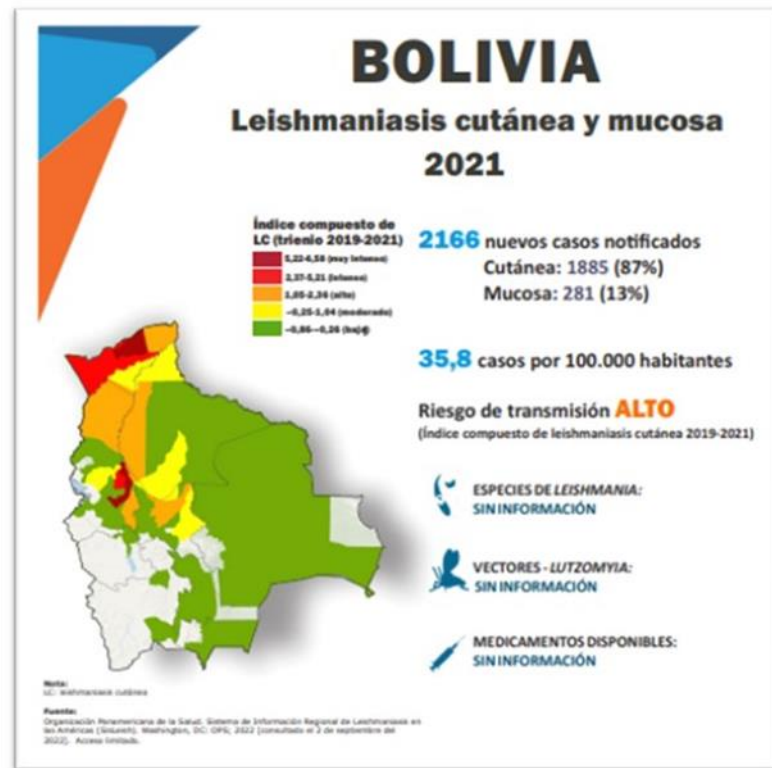


Figura 11. A) Departamentos de Bolivia con LT presente, B) Situación epidemiológica de la LC y LM en Bolivia en 2021. (Modificado de OPS/OMS, 2022b. https://panaftosa.org/leish/inf2022_es/INFOGRAFICO_ESP_2022_BOL.pdf)

El amplio polimorfismo epidemiológico de la LT está relacionado con la ecología de los vectores y las actividades de las personas. En las zonas endémicas de Pando y Alto Beni, la infección se produce en la selva durante el día, en la recolecta de productos o durante el desmonte (Le Pont et al., 1992). En la zona del Chapare (Cochabamba), se reportaron casos de transmisión autóctona, urbana, con presencia de vectores capturados y niños infectados en peri e intradomicilio, pero se requieren más estudios que confirmen la adaptación al hábitat del vector (Ballart et al., 2016; Rojas et al., 2009). Por otro lado, la LC en Bolivia está asociadas con el sexo, la edad, el vivir en /o cerca del bosque o trabajar en áreas boscosas en la mayoría de los casos (García et al., 2009; Rojas et al., 2009) y, en pocas ocasiones, se asocian al turismo. Se ha encontrado que, en la zona endémica de los Yungas de La Paz, el riesgo de contraer la LC incrementa de 3 a 10 veces más en la población migrante que en la población nativa (Alcais et al., 1997).

Según los datos epidemiológicos de LC y LM reportados en 2021 (**Figura 11**), Bolivia presenta un nivel de transmisión alto, siendo el Índice Compuesto de Transmisión de LC (ICTLc) muy intenso en las zonas tropicales y sub-tropicales de La Paz (los Yungas) y Pando y un ICTLc Intenso en los departamentos de La Paz, Pando, Beni, Cochabamba ([OPS/OMS, 2022b](#)). La zona de los Yungas, en La Paz, es una colonización antigua, que se caracteriza por presentar una selva secundaria (zona sub-tropical), con plantaciones de café, frutales y con residuos de selva primaria. La transmisión en esta zona (contacto-vector-reservorio humano) es mayor de enero a marzo (temporada de lluvias) ([Desjeux et al., 1986](#)). En el Alto Beni y en la región de la Amazonia, donde el asentamiento humano está muy disperso y en contacto estrecho con la selva primaria virgen, la transmisión se asocia a actividades de exposición laboral, como tala y chaqueo ([Desjeux et al., 1986](#); [García et al., 2009](#)). En el departamento de Cochabamba, una de las zonas endémicas más importantes lo constituye el municipio de Villa Tunari, ubicado en la provincia del Chapare a una altitud de 200 a 400 m.s.n.m, donde el clima es húmedo tropical, sus alrededores están formados de bosques tropicales de valle, que rodean la vía fluvial del río Chapare ([Ballart et al., 2016](#)). En la zona endémica del departamento de Tarija (provincia de Aniceto Arce), municipio de Bermejo (frontera con Argentina), la región es boscosa y húmeda, la población se dedica principalmente al cultivo de la caña de azúcar. En esta zona, los hábitos de la población migrante de la región andina incrementan la exposición al vector. Para dedicarse a la zafra la población se asienta en viviendas precarias de madera y caña, al borde de los cultivos de caña y cercanía a los ríos ([Mollinedo et al., 2020a](#)).

1.6.2 ESPECIES DE *LEISHMANIA* QUE CAUSAN LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA

Las especies de *Leishmania* que han sido identificadas en Bolivia por diferentes investigadores son cinco (Tabla 5).

Tabla 5. Especies de *Leishmania* que circulan causando LT en las áreas endémicas de Bolivia

Subgénero	Complejo	Especie	Autores
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Adaui et al., 2016; Bastrenta et al., 2003 Bermúdez et al., 1993; Bilbao-Ramos et al., 2017; Buitrago et al., 2011; Campos-Muñoz et al., 2007; Del Rosal et al., 2009 Desjeux et al., 1987; Dimier-David et al., 1991; Garcia et al., 2004;. 2007a; 2007b; La Fuente et al., 1986; Le Pont & Desjeux, 1986; Martinez et al., 1998; Torrez-Espejo et al., 1989; Revollo et al., 1992; Riesco et al., 2007; Torrico et al., 2009; Urjel et al., 1987
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	Garcia et al., 2005; 2007b
	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>	Bilbao-Ramos et al., 2017; Buitrago et al., 2011; Garcia et al., 2004;; 2007a; 2007b
<i>Leishmania</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	Bastrenta et al., 2003; Bilbao-Ramos et al., 2017
		<i>L. amazonensis</i>	Buitrago et al., 2011; Kerr et al., 2006; Martinez et al., 1998; Martinez et al., 2002; Telleria et al., 1999

1.6.3 FORMAS CLÍNICAS DE LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA

La LC se presenta generalmente en las zonas descubiertas del cuerpo, iniciándose, en el lugar de la picadura del flebotomo, como una placa eritematosa, que evoluciona a un nódulo pruriginoso y se ulcera a los 16 días. Las lesiones pueden ser únicas o múltiples, de diferente forma y diámetro,

con bordes elevados e indurados e indoloras (Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a). Con mayor frecuencia, se localizan en los miembros inferiores (53,8%) (Dimier-David et al., 1991; Mollinedo & Mollinedo, 2020b). También se ha observado que las lesiones cutáneas pueden adquirir diferentes formas de presentación clínica: ulcerativa en 62,5% de los casos (lesiones en forma de cráter, con bordes levantados), infiltrativa 7,1% (lesione discontinua, tipo esponja), nodular en 16,3% (nódulo indurado, que evoluciona formándose una úlcera), proliferativa en 5,9% (una lesión que se desarrolla sobresaliendo de la piel lesionada), verrucosa en 5,5% (lesión en forma de verruga que prolifera en forma irregular sobre la piel lesionada (Bermúdez et al., 2002) (**Figura 12**).

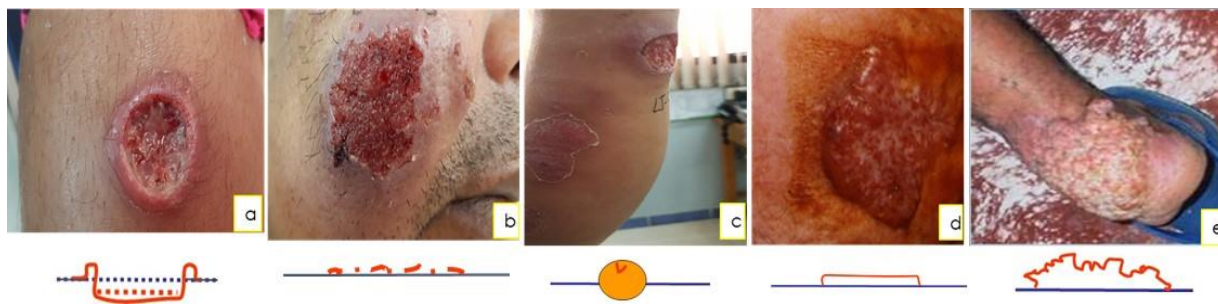


Figura 12. Tipos de lesiones cutáneas de la leishmaniosis en Bolivia con sus respectivas características gráficas en la parte inferior: a) ulcerativa, b) infiltrativa, c) nodular, d) proliferativa, e) verrucosa. (Tomado de Bermúdez et al., 2002)

La LM constituye el 8% de los casos reportados de LT y se presume que podría ser debido a la falta de un diagnóstico oportuno, tratamiento inadecuado, el diagnóstico tardío, la falta de tratamiento de una LC (Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a). Aproximadamente un 20% de los pacientes con LC suelen evolucionar a LM (García et al., 2009), siendo la ubicación geográfica, el origen étnico y los factores genéticos del paciente, los que podrían incrementar el riesgo de evolución a lesiones mucosas (Alcais et al., 1997). Así mismo, se sabe que *L. braziliensis* es capaz de migrar hacia las mucosas produciendo LM, a diferencia de las otras especies de *Leishmania* que circulan en Bolivia. Por lo que, teniendo en consideración que *L. braziliensis* es la especie más frecuente identificada como causante de LT (García et al., 2007a), existe un riesgo mayor de que las lesiones cutáneas puedan evolucionar a LM. La relación LC/LM fue disminuyendo de 1/3 en el periodo 2001 al 2006 a 37/1 en el 2012. Esta reducción de la relación se debe, probablemente, a que los pacientes acuden con mayor frecuencia a los servicios de salud a recibir su tratamiento (Luna et al., 2012).

Las lesiones mucosas pueden limitarse a la mucosa nasal y del paladar en un 38,7% de los pacientes, o extenderse desde la mucosa nasal al paladar y faringe o laringe en un 28,4 % y en un 32,7% de pacientes afectar a toda la mucosa otorrinolaríngea (Dimier-David et al., 1991) (Figura 13).



Figura 13. Tipos de lesiones mucosas en Bolivia: a) fosas nasales, b) paladar blando, c) labio inferior. (Tomado de Torrico & Zubieta, 2010)

1.6.4 CICLO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA

El ciclo de la LT era inicialmente silvestre, estando la enfermedad relacionada con actividades en la selva (García et al., 2009). En los Yungas de La Paz, y en niños menores de 5 años, la prevalencia de LT es del 8%, lo cual sugiere que la transmisión sería peridoméstica y/o doméstica. Así mismo, el 65 % de los pacientes tienen LC antes de los 10 años de residencia, principalmente con úlceras en la cara y en ambos sexos, lo que podría deberse a cambio en los hábitos de las especies de vectores o, incluso, al cambio de las especies de vectores principales en las áreas peridomésticas y domésticas (Ballart et al., 2016; Le Pont et al., 1992; Mollinedo & Mollinedo, 2020b). Así mismo, se reportó que en los Yungas de La Paz, *Lu. nuneztovari anglesi*, vector de *L. amazonensis*, vive en los cafetales y en la noche ingresa en los domicilios donde se alimenta, volviendo a abandonar el domicilio de madrugada, confirmando la transmisión intradomiciliaria (Le Pont et al., 1992). En los Yungas de La Paz, el patrón de transmisión de LT (contacto-vector-reservorio humano) se produce en época de lluvia (enero a marzo), donde hay inundaciones y los animales reservorios potenciales invaden las casas en busca de refugio y alimento, época que coincide con la densidad altas del vector. En cambio, en el Alto Beni la infección se produce por exposición laboral durante la tala y chaqueo en época seca (julio a septiembre) (Mollinedo & Mollinedo, 2020b).

Es importante también mencionar que el riesgo para contraer LC podría estar influenciado por el tipo de población, por ejemplo, la población nativa tiene menos riesgo de contraer LC que la población migrante; en este ámbito se ha reportado que el riesgo relativo de contraer LC es 10 veces más en los primeros 5 años de vida y tres veces más entre el grupo etario de 5 a 20 años en la población migrante que en la población nativa, volviéndose similar en los siguientes años, lo cual podría estar influenciado por las características genéticas de la población (Alcais et al., 1997; Rojas et al., 2009).

En la zona endémica del Chapare- Cochabamba (Parque Isiboro Sécore), la asociación de LC con el género masculino, la edad y la migración al bosque, demuestra que la mayor parte de la transmisión de *L. braziliensis* es selvática (Rojas et al., 2009). Por otra parte, estudios posteriores han reportado la presencia de dos incriminados vectores de leishmaniosis (*Lu. shawi* y *Lu. yuilli yuilli*) en zona urbanizada y en intradomicilio; sin embargo, son necesarios más estudios entomológicos en la provincia del Chapare para confirmar el papel del flebotomo vector, la transmisión intradomiciliaria de la enfermedad y la presencia de casos autóctonos de LC (Ballart et al., 2016).

Reservorios

Los reservorios de la LT, constituyen especies de roedores introducidas (*Mus musculus* y *Rattus rattus*) y siete especies nativas (*Calomys fecundus*, *Akodon* sp., *Balomys* sp., *Oligoryzomys destructor*, *Oxymycterus* sp., *Oxymycterus paramensis* y *Thylamys venustus*), entre otros (Mollinedo & Mollinedo, 2020b) (Figura 14).



Figura 14. Reservorios de *Leishmania* en zonas endémicas de Bolivia. a) *Oryzomys* spp. b) *Didelphis albiventris*, c) *Dasypus* spp., d) *Galea musteloides*, e) *Choloepus* spp. (Fotografías de archivos del Laboratorio de Parasitología, LABIMED, Facultad de Medicina, UMSS).

En la zona endémica de Tarija, al sur de Bolivia, los reservorios más importantes citados con respecto a *L. braziliensis*, fueron los perros, roedores y marsupiales (Mollinedo et al., 2020a). En los Yungas de La Paz, el perro es el reservorio de *L. infantum*, así como de *L. braziliensis*. También en el Alto Beni el perro es una víctima más de *L. braziliensis*, al igual que el ser humano, lo cual indica que el parásito circula en la periferia en su ciclo secundario sin tener que pasar posiblemente por su ciclo silvestre (Le Pont et al., 1989a).

Flebotomos

Se han identificado 112 especies de flebotomos que circulan en Bolivia, de las cuales 38 tienen hábitos antropofílicos y solo ocho especies están incriminadas en la transmisión de la LT en seres humanos: *Lutzomyia carrerai carrerai*, *Lu. llanosmartinsi*, *Lu. yucumensis*, *Lu. shawi*, *Lu. longipalpis*, *Lu. ayrozai*, *Lu. flaviscutellata* y *Lu. nuneztovari* (Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a). En la provincia del Chapare, en el departamento de Cochabamba, fueron capturadas seis especies del género *Lutzomyia* en el peri- e intradomicilio (Figura 15): *Lu. aragaoi*, *Lu. anderson*, *Lu. antunesi*, *Lu. shawi*, *Lu. yuilli yuilli* y *Lu. auraensis*, de las cuales solo dos especies fueron capturadas en zonas urbanas y en peri-domicilio (Ballart et

al., 2016). *Lu. shawi*, también ha sido capturada en un ambiente doméstico y peridoméstico en el Parque Isiboro Sécore (Cochabamba, Bolivia), siendo incriminada como vector de *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (García et al., 2007b). Otra de estas especies, *Lu. auraensis* ha sido incriminada en Perú, como vector de *L. braziliensis*, y *L. lainsoni* (Valdivia et al., 2012). *Lu. y. yuilli* ha sido hallada parasitada por *Leishmania* spp. en la Amazonia de Perú (Zorrilla et al., 2017).



Figura 15. Ambiente del peri- e intra-domicilio en la zona endémica de leishmaniosis de Villa Tunari (Chapare, Cochabamba, Bolivia) con trampa luminosa de captura de flebotomos (imagen cedida por M. Gállego).

En el municipio de Bermejo, en la zona del sur de Bolivia frontera con Argentina, fueron identificados *Nyssomyia neivai* como vector de *L. braziliensis*, *Migonemyia migonei* (especie antropofílica) como vector de *L. infantum* y *Evandromyia cortelezzi* vector de *L. braziliensis*, siendo la de mayor abundancia *Ny. neivai* (92,6 %), en bosques secundarios y ambientes peridomésticos asociados con casos humanos (cultivos, viviendas y en los bosques de galerías de los ríos principales) (Mollinedo et al., 2020a).

Tabla 6. Especies de *Leishmania* aisladas de reservorios y flebotomos en Bolivia

Especie	Reservorios	Flebotomos	Autores
<i>L. braziliensis</i>	<i>Canis familiaris</i> <i>Conepatus chinga</i>	<i>Psychodopygus nunestovari</i> <i>anglesi</i> <i>Lutzomyia shawi</i> <i>P. llanosmartinsis</i> y <i>P. yucumensis</i>	Buitrago et al., 2011 Garcia et al., 2007b Le Pont & Desjeux, 1986 Le Pont et al., 1989 ^a Telleria et al., 1999
<i>L. guyanensis</i>	-----	<i>Lu. shawi</i>	Garcia et al., 2007b
<i>L. lainsoni</i>	<i>C. chinga</i>	-----	Buitrago et al., 2011
<i>L. amazonensis</i>	<i>Oryzomys acritus</i> , <i>O. nitidus</i> , <i>Akodon</i> spp. <i>Oligoryzomys</i> spp.	<i>Py. nuneztovari</i> <i>anglesi</i>	Buitrago et al., 2011 Kerr et al., 2006 Telleria et al., 1999
<i>L. infantum</i>	<i>Coendou prehensilis</i> <i>C. chinga</i> <i>Canis familiaris</i>	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. shawi</i>	Buitrago et al., 2011 Dantas-Torres, 2009 Marcondes & Day, 2019 Le Pont et al., 1989b

1.6.5 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA

En Bolivia, en todos los establecimientos de salud, el diagnóstico de la LT se inicia con el diagnóstico epidemiológico, con la finalidad de conocer si el paciente ha estado expuesto a posibles vectores infectados; para ello, se obtiene información de la procedencia y residencia del paciente, factores sociales, ambientales y climatológicos del entorno del paciente y presencia de animales con lesiones sospechosas de leishmaniosis ([Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a](#)). El segundo paso constituye en realizar el diagnóstico clínico ([García et al., 2009](#)), detectándose los casos sospechosos de LC, con presencia de lesiones ulcerosas de bordes levantados y que no responden al tratamiento con antibióticos, además de posibles cicatrices características de episodios anteriores de LC. Los casos de LM se identifican por la presencia de obstrucción o perforación nasal, antecedente de epistaxis y cicatriz cutánea típica ([Alcáis et al.,](#)

1997). Finalmente, los pacientes son derivados al laboratorio para su confirmación de caso sospechoso, mediante pruebas de laboratorio (**Figura 16**).

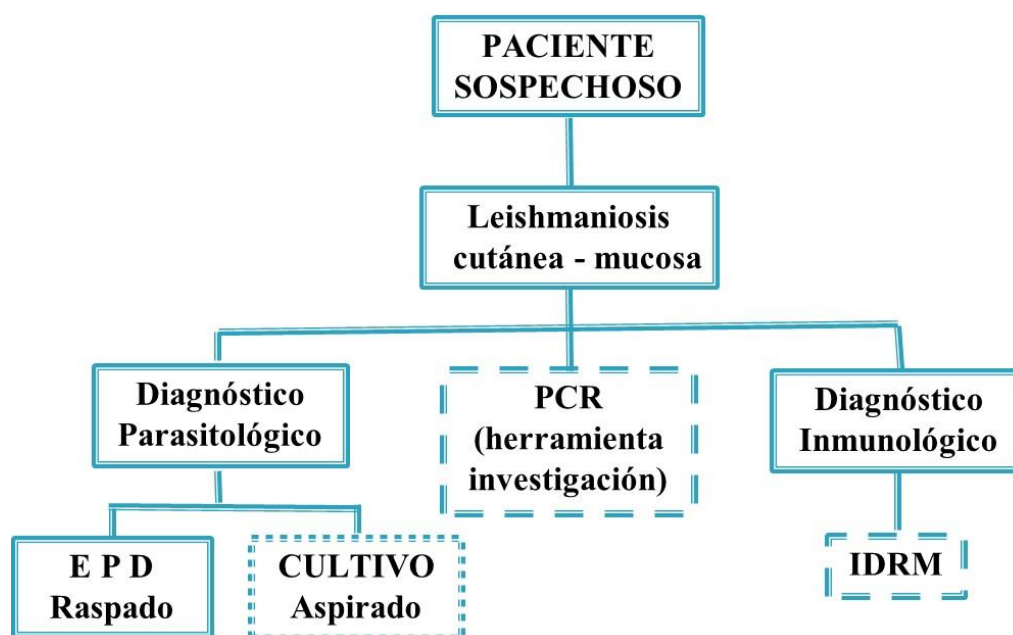


Figura 16. Técnicas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de la LT en Bolivia. Recuadro en: línea continua, realizado en laboratorios de 1°, 2° y 3° nivel; en línea punteada, en pocos laboratorios de 2° y 3° nivel con técnicas implementadas; en línea cortada, en laboratorios de 3° nivel que tienen la técnica implementada. Fuente: elaboración propia.

El **examen parasitológico directo (EPD)** y tinción de Giemsa en muestras obtenida por raspado (**Figura 17**), es la prueba que está disponible en la mayoría de los laboratorios de primer, segundo o tercer nivel de atención. Sin embargo, pocos laboratorios la tienen implementada.

El **cultivo** para *Leishmania* se suele realizar con muestra de aspirado obtenida del borde la lesión (**Figura 17**), solo se la realiza en los laboratorios de tercer nivel en las ciudades de Cochabamba, Santa Cruz y La Paz y en dos laboratorios de 2° nivel de las zonas endémicas de Cochabamba, Villa Tunari (Chapare) e Ibuelo (Carrasco tropical). La sensibilidad del cultivo es superior a la del EPD, entre 85 a 90% (Bermudez et al., 2005; Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a); sin embargo, requiere de infraestructura y personal capacitado.



Figura 17. Toma de muestras biológicas para el diagnóstico de la LT: A la izquierda, toma de muestra de raspado del borde la lesión para EPD. Al centro, toma de muestra por aspirado de la lesión en paladar blando. A la derecha aspirado de lesión en fosa nasal. (tomado de: García et al., 2009).

Las pruebas moleculares, como la PCR, se limitan, en Bolivia, a fines de investigación o estudios epidemiológicos, debido al coste, necesidad de infraestructura especializada y personal técnicamente capacitado (García et al., 2009).

En Bolivia, la utilidad de las pruebas serológicas en el diagnóstico de la LT es cuestionable, debido a la baja producción de anticuerpos específicos en LC (Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a). Su sensibilidad es variable, dependiendo de la cronicidad de las lesiones. Según datos publicados en zonas endémicas de La Paz, la serología ha mostrado una sensibilidad del 5% en pacientes con LT confirmada por pruebas parasitológicas (Luna et al., 2012). Otro problema del diagnóstico serológico radica en la presencia de posibles infecciones mixtas *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*, o la presencia de reacciones cruzadas con *T. cruzi* detectándose falsos positivos (Bastrenta et al., 2003).

La **IDRM**, se utiliza ocasionalmente en el diagnóstico de LT, y presenta el inconveniente de que no es capaz de discriminar infecciones previas en pacientes con episodios anteriores de LC o lesiones activas (García et al., 2009). Además, la IDRM no es una prueba confirmatoria y los reactivos no están autorizadas o disponibles en el comercio (Carstens-Kass et al., 2021).

1.6.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS LEISHMANIAS EN BOLIVIA

La caracterización de especies de *Leishmania* en Bolivia se realiza con fines de investigación. La técnica utilizada inicialmente para la caracterización de especies fue la isoenzimática **MLEE**, utilizando ocho sistemas enzimáticos, observándose que las enzimas GPI y MDH, tienen vital

importancia en la caracterización de cepas de canes y de humanos en la región fronteriza con Argentina, siendo *L. (V.) braziliensis*, la especie aislada con mayor frecuencia en esta región (Mollinedo & Mollinedo, 2020b). Otro estudio realizado utilizando isoenzimas con cepas de la región sub andina de La Paz, puso en evidencia la presencia de *L. amazonensis*, siendo la enzima MPI de importancia para su caracterización (Martinez et al., 1998).

En la actualidad, se utilizan métodos moleculares para la caracterización de *Leishmania*, como la técnica **PCR-RFLP**, usando como blanco el gen *hsp70* y la enzima de restricción *HaeIII*, en una primera restricción, obteniéndose patrones de bandas individuales y compartidas por dos o más especies. Realizando digestiones con otras enzimas es posible la discriminación de especies (Montalvo et al., 2016). Esta técnica ha mostrado resultados satisfactorios en la caracterización de especies de *Leishmania*, ya sea a partir de muestras directas obtenidas por raspados del borde de las úlceras de pacientes con LC, así como en vectores en estudios de campo en la Amazonia boliviana (García et al., 2007a; García et al., 2007b). Así mismo, la PCR-RFLP utilizando como marcador ITS rRNA, marcador genético altamente polimórfico, ha sido capaz de discriminar a *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. lainsoni* y *L. infantum* (Buitrago et al., 2011).

También la amplificación por PCR de los marcadores Cyt-b y la región ITS-1 y la secuenciación de sus productos digeridos de las enzimas de restricción *AseI* y *HaeIII*, para el análisis filogenético posterior, ha permitido la caracterización de *L. braziliensis*, *L. lainsoni* y *L. amazonensis* (Bilbao-Ramos et al., 2017).

1.6.7 TRATAMIENTO Y FALLA TERAPÉUTICA

Actualmente, el tratamiento de la LT en Bolivia es gratuito, estando subvencionado por el Programa nacional de leishmaniosis (Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia, 2015b). Los medicamentos subvencionados por el Ministerio de Salud, a través del Programa Nacional de leishmaniosis, son: Antimoniales Pentavalentes y Desoxicolato de Anfotericina B. Solo en casos de FT repetidas, las autoridades departamentales hacen lo posible para conseguir donaciones de otros medicamentos como Anfotericina B Liposomal, Anfotericina B Complejo Lipídico, Miltefosina, Isotianato de Pentamidina, Ketoconazol e Itraconazol, entre otros. La aplicación del tratamiento se realiza en el ambulatorio, cuando se usan medicamentos de primera línea (Antimoniales Pentavalentes) y si son utilizados medicamentos de segunda línea

(Anfotericina B), se requiere internación hospitalaria ([Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a](#)).

La respuesta al tratamiento con Antimoniales, depende de la especie y cepa del parásito, del estado inmunológico del paciente y de la forma clínica de la enfermedad ([Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a](#)). El Estibogluconato de Sodio genérico (SSG) ha mostrado ser seguro en el tratamiento de la LC, con una eficacia de curación clínica del 94,2%, en comparación a una cohorte de pacientes con LC tratados con Glucantime en 2001-2002 que mostró 90% de curación clínica ([Bermúdez et al., 2006](#)). En el tratamiento de la LC con Antimoniato de Meglumina se ha observado que se produce interrupción del tratamiento en el 4,1% de los pacientes por presencia de efectos colaterales, que conlleva al 1,3% de FT al tratamiento estándar y una reactivación en 1,7% de los casos. En la LM tratada con Anfotericina B se ha observado una mayor tasa de interrupción del tratamiento (10,4% de casos), menor proporción de FT y menor reactivación (0,5%) ([Dedet et al., 1995](#)). Los pacientes con LM leve tratados con Miltefosina muestran una eficacia del 83%, mientras que en pacientes con LM más extensas es inferior, 58%; sin embargo, su toxicidad es mayor a la de los Antimoniales y Anfotericina B ([Soto et al., 2007](#)).

En Bolivia, también se han utilizado tratamientos combinados con Pentamidina, Miltefosina y Paramomicina en pacientes con FT a Glucantime®, y Antimonio, Miltefosina e Itraconazol, ambos con buenos resultados de lesiones cicatrizadas sin reactivarse en 21 meses de seguimiento de control en LC ([Rojas et al., 2021](#)) y hasta 5 años de seguimiento en LM ([Rojas et al., 2017](#)). También ha sido probada la aplicación perilesional de Glucantime® en pacientes con LC y falla terapéutica a un primer ciclo de tratamiento sistémico con Glucantime®, mostrándose la cicatrización completa de la lesión a la conclusión de cinco sesiones ([Rojas et al., 2019](#)).

Por la toxicidad que presentan los medicamentos utilizados en el tratamiento de la LT, es necesario que el paciente tenga el diagnóstico confirmativo de LT por pruebas parasitológicas, además de que no padezca patologías cardiacas, renales o hepáticas para reducir el riesgo de efectos secundarios ([Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a](#)).

1.6.8 VIGILANCIA Y CONTROL

Como estrategia de prevención y control, el Programa Nacional de Control de la Leishmaniosis de Bolivia, emitió recomendaciones básicas destinadas a reducir el contacto de los seres humanos con el vector, para evitar las picaduras de insectos en áreas endémicas, principalmente al amanecer y al atardecer, promoviendo el uso de repelentes de insectos, mallas milimétricas en puertas y ventanas (Mollinedo & Mollinedo, 2020b). También se ha utilizado fumigación de interiores de viviendas con insecticidas y materiales impregnados de insecticidas (García et al., 2009). Sin embargo, estas estrategias no pueden ser implementadas por falta de financiamiento de forma similar a otras enfermedades de transmisión vectorial.

Otra estrategia de control de la LT, es realizar el diagnóstico confirmativo temprano y el tratamiento adecuado de los casos confirmados, a fin de reducir las secuelas, la incapacidad y la mortalidad (Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a).

II. HIPOTESIS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.1 HIPÓTESIS

El diagnóstico de la LT humana comporta una correcta toma de muestras y aplicación de técnicas de diagnóstico. La toma de muestras es variable (biopsia, exudado, aspirado) y las pruebas diagnósticas son muchas y basadas en distintos principios (parasitológicas, inmunológicas, moleculares). Además, algunas de las técnicas de diagnóstico son modificaciones recientes de las técnicas clásicas o bien de reciente incorporación al diagnóstico de la LT en Sudamérica. Por otro lado, son escasos los resultados de la sensibilidad de las distintas técnicas para una misma muestra.

En lo que respecta al agente responsable del cuadro de LT, en Bolivia coexisten varias especies. Sin embargo, son escasos los estudios en los que se realiza la caracterización de las leishmanias, por lo que no se suele realizar un tratamiento específico y no se tienen datos acerca de la falla terapéutica.

El estudio integral de la LT en Cochabamba, utilizando diversas muestras y técnicas de diagnóstico, permitiría optimizar la metodología a emplear para su diagnóstico en laboratorios de primer y segundo nivel, así como el tiempo de obtención de resultados e incrementar la sensibilidad del diagnóstico. La caracterización de las especies de *Leishmania* permitiría obtener nuevos datos acerca de las especies presentes y de su diversidad clínica.

II. 2 OBJETIVOS/OBJETIVES/ OBJECTIFS

II.2 OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo fue optimizar el diagnóstico parasitológico de la leishmaniosis tegumentaria (cutánea y mucosa) y caracterizar las especies de *Leishmania* causantes del cuadro clínico en pacientes que asisten al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la UMSS en Cochabamba, Bolivia.

Los **objetivos específicos** de la investigación fueron:

1. Realizar un estudio sistematizado del rendimiento de la secuenciación del gen *hsp70* de aislados de *Leishmania* causantes de leishmaniosis tegumentaria en Bolivia con especial hincapié en el estudio del complejo *Leishmania braziliensis* y su relación con las características clínicas.
2. Evaluar la utilidad de MALDI-TOF MS en la caracterización de las especies de *Leishmania* causantes de leishmaniosis tegumentaria en Bolivia, utilizando como técnica de referencia la secuenciación del gen *hsp70*.
3. Evaluar la utilidad de diferentes métodos de toma de muestra y técnicas diagnósticas parasitológicas para el diagnóstico de la leishmaniosis tegumentaria con el fin de optimizar dicho diagnóstico en Bolivia.

II.2 Objectives

The **general objective** of the present work was to optimize the parasitological diagnosis of tegumentary leishmaniasis (cutaneous and mucosal) and to characterize the *Leishmania* species causing clinical symptoms in patients attending the Parasitology Laboratory of the Faculty of Medicine of the UMSS in Cochabamba, Bolivia.

The **specific objectives** of the research were:

1. To carry out a systematic study of the performance of the *hsp70* gene sequencing of *Leishmania* isolates that cause tegumentary leishmaniasis in Bolivia with special emphasis in the study of the *Leishmania braziliensis* complex and its relationship with clinical characteristics.
2. To evaluate the usefulness of MALDI-TOF MS in the characterization of *Leishmania* species that cause tegumentary leishmaniasis in Bolivia, using *hsp70* gene sequencing as a reference technique.
3. To evaluate the usefulness of different sampling methods and parasitological techniques for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis and to optimize the diagnosis of this disease in Bolivia.

II.2 Objectifs

L'objectif général du présent travail était d'optimiser le diagnostic parasitologique de la leishmaniose tégumentaire (cutanée et muqueuse) et de caractériser les espèces de *Leishmania* provoquant le tableau clinique chez les patients fréquentant le Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de l'UMSS de Cochabamba, Bolivie.

Les **objectifs spécifiques** de la recherche étaient:

1. Réaliser une étude systématisée des performances du séquençage du gène *hsp70* des isolats de *Leishmania* responsables de la leishmaniose tégumentaire en Bolivie avec une attention particulière à l'étude du complexe *Leishmania braziliensis* et sa relation avec les caractéristiques cliniques.
2. Évaluer l'utilité de la MALDI-TOF-MS dans la caractérisation des espèces de *Leishmania* responsables de la leishmaniose tégumentaire en Bolivie, en utilisant le séquençage du gène *hsp70* comme technique de référence.
3. Évaluer l'utilité des différentes méthodes de prélèvement et techniques de diagnostic parasitologique pour le diagnostic de la leishmaniose tégumentaire afin d'optimiser le dit diagnostic en Bolivie.

II.3 PLAN DE TRABAJO

II.3.1 CENTROS DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO

El proyecto ha sido desarrollado en los siguientes centros:

- Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Simón en Cochabamba (Bolivia), donde han sido visitado los pacientes, se ha procedido a la toma de muestras y a realizar el diagnóstico parasitológico.
- El Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación CEADES y Medio Ambiente en Cochabamba (Bolivia), donde se ha realizado la adaptación de los aislados de *Leishmania* en cultivo "in vitro" en medio de Schneider, una vez que se han obtenido los cultivos positivos en medio difásico NNN, y finalmente ser crioconservado a -70°C.

- La Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Universitat de Barcelona (UB), Barcelona (España), donde se realizó la caracterización molecular de los aislados de *Leishmania*, obtenidos entre 2014-2015, depositados en el criobanco de tripanosomátidos de la UB, procedentes de Bolivia, obtenidas en un proyecto de cooperación España – Bolivia.
- El Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (SMHSP) en Barcelona (España), donde se ha realizado la identificación de las leishmanias por MALDI-TOF.

II.3.2 ETAPAS DE DESARROLLO DEL PROYECTO

Este proyecto incluye varias etapas:

- Toma de muestras de pacientes, con lesiones compatibles con LT, para el aislamiento por cultivo de las leishmanias destinadas a la caracterización molecular por secuenciación del gen *hsp70* (septiembre 2014 - noviembre 2015: 32 pacientes, 41 cepas).
- Ampliación de las muestras para el estudio de la idoneidad MALDI-TOF en la caracterización de las leishmanias teniendo como técnica de referencia, la secuenciación del gen *hsp70* (2004 (1 cepa), 2009 (1 cepa) 2016 (1 cepa) - septiembre 2014 a octubre 2015: 44 pacientes, 55 cepas):
- Toma de muestra de pacientes, con lesiones compatibles con LT, para el estudio comparativo del diagnóstico parasitológico [octubre del 2017 a julio del 2018: 117 pacientes, 242 muestras (121 aspirados y 121 raspados)]

II.3.3 METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EL ESTUDIO

Caracterización molecular del complejo *Leishmania braziliensis* y análisis de polimorfismo.

Caracterización de otras especies de *Leishmania* aisladas en Bolivia

Esta parte del estudio fue desarrollado en la sección de Parasitología de la UB (Barcelona, España) donde se desarrollaron las siguientes actividades:

- a) Descongelación y cultivos en masa de promastigotes de aislados de *Leishmania* depositados en el Criobanco de Tripanosomátidos de la UB y procedentes de casos de LT provenientes de Cochabamba (Bolivia).

- b) Caracterización del complejo de *Leishmania braziliensis* por secuenciación del gen *hsp70*.
- c) Análisis de polimorfismos del gen *hsp70* del complejo *L. braziliensis*.
- d) Análisis de la forma clínica de leishmaniosis con las especies del complejo *L. braziliensis* que causan LT en Bolivia.
- e) Comparación de los resultados de caracterización por secuenciación del gen *hsp-70* con la identificación por MALDI-TOF MS (conjuntamente con el SMHSP).

Caracterización de *Leishmania* spp. por MALDI-TOF MS

Realizada en la sección de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España) donde se desarrollaron las siguientes actividades:

- a) Preparación de las leishmanias para ser analizados por MALDI-TOF MS.
- b) Caracterización de especies de *Leishmania* por técnicas proteómicas, MALDI-TOF MS
- c) Interpretación de resultados del MALDI-TOF MS.
- d) Comparación de los resultados de caracterización de especies de *Leishmania* por MALDI-TOF MS con los resultados de caracterización por secuenciación del gen *hsp70* (conjuntamente con la UB).

Técnicas parasitológicas aplicadas al diagnóstico de la leishmaniosis tegumentaria en Bolivia

Esta parte del estudio fue realizada en el Laboratorio de Parasitología de la UMSS y el Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación CEADES, Cochabamba, Bolivia, donde se desarrollaron las siguientes actividades:

- a) Captación pasiva de pacientes con sospecha de LT (121 pacientes, 242 muestras (121 de aspirado y 121 de raspado) para la evaluación de las diferentes metodologías en la toma de muestras y técnicas de diagnóstico parasitológico utilizadas.
- b) Toma de muestras biológicas, por aspirado y raspado, para la evaluación de las diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico.
- c) Realización del examen parasitológico directo
- d) Realización del cultivo en medios TSTB, minicultivo y microcultivo en medio Schneider, utilizando las muestras de aspirado y raspado.
- e) Análisis de resultados y evaluación de la utilidad de los diferentes métodos de diagnóstico utilizando los dos métodos de toma de muestras (conjuntamente con UB y SMHSP).

III. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

“Tegumentary leishmaniosis by *Leishmania braziliensis* complex in Cochabamba, Bolivia including the presence of *L. braziliensis* outlier”

LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA POR EL COMPLEJO DE *LEISHMANIA*
BRAZILIENSIS EN COCHABAMBA, BOLIVIA INCLUYENDO LA
PRESENCIA DE *L. BRAZILIENSIS* ATÍPICA O OUTLIER

Leishmaniosis Tegumentaria en Cochabamba, Bolivia

Mary Cruz Torrico, Anna Fernández-Arévalo, Cristina Ballar, Marco Solano, Alba Abras,
Ernesto Rojas, Joaquim Gascón, Eva Ariza, Silvia Tebar, Daniel Lozano, Albert Picad, Carmen
Muñoz, Faustino Torrico, Montserrat Gállego.

TRANSBOUNDARY AND EMERGING DISEASES 2021, p. 1-14

Factor de impacto: 4.521

RESUMEN

La leishmaniosis está causada por protozoos del género *Leishmania*, que incluye más de 20 especies capaces de infectar a los humanos en todo el mundo. En América, la especie más extendida es *L. braziliensis*, presente en 18 países, incluido Bolivia. La posición taxonómica del complejo *L. braziliensis* ha sido objeto de controversia, complicada aún más por la reciente identificación de una subpoblación particular llamada *L. braziliensis* atípica o outlier. El objetivo de este estudio fue realizar un análisis sistemático del complejo *L. braziliensis* en Bolivia y describir las características clínicas asociadas. Se analizaron 41 cepas mediante la secuenciación de un fragmento amplificado de 1245 pb del gen *hsp70*, lo que permitió su identificación como: 24 (59%) *L. braziliensis*, 16 (39%) *L. braziliensis* atípica y una (2%) *L. peruviana*. En un dendrograma construido, *L. braziliensis* y *L. peruviana* se agrupan en el mismo grupo, mientras que *L. braziliensis* atípica aparece en una rama separada. La alineación de secuencias permitió la identificación de cinco posiciones de nucleótidos no polimórficas (288, 297, 642, 993 y 1213) que discriminan *L. braziliensis* y *L. peruviana* de *L. braziliensis* atípica. Además, las posiciones de nucleótidos 51 y 561 permiten a *L. peruviana* ser discriminado de los otros dos taxones. Se observó

una mayor diversidad en *L. braziliensis* outlier que en *L. braziliensis-L. peruviana*. Las 41 cepas provinieron de 32 pacientes con leishmaniosis tegumentaria, de los cuales 22 pacientes (69%) presentaron lesiones cutáneas (11 causadas por *L. braziliensis* y 11 por *L. braziliensis* atípica) y 10 pacientes (31%) lesiones mucocutáneas (ocho causada por *L. braziliensis*, una por *L. braziliensis* atípica y otra por *L. peruviana*). Nueve pacientes (28%) proporcionaron simultáneamente dos aislamientos, cada uno de una lesión distinta, y en cada caso se identificó el mismo genotipo en ambos. Se observó fracaso del tratamiento en seis pacientes infectados con *L. braziliensis* y un paciente con *L. peruviana*.

Palabras claves: Bolivia, características clínicas, complejo *Leishmania braziliensis*, respuesta al tratamiento, secuenciación del gen *hsp70*, leishmaniasis tegumentaria humana



Received: 2 May 2021 | Revised: 27 June 2021 | Accepted: 5 July 2021

DOI: 10.1111/tbed.14228

Transboundary and Emerging Diseases

WILEY

ORIGINAL ARTICLE

Tegumentary leishmaniasis by *Leishmania braziliensis* complex in Cochabamba, Bolivia including the presence of *L. braziliensis* outlier

Tegumentary leishmaniasis in Cochabamba, Bolivia

Mary Cruz Torrico^{1,2,3} | Anna Fernández-Arévalo^{3,4,*} | Cristina Ballart^{3,5,*} | Marco Solano¹ | Ernesto Rojas¹ | Eva Ariza^{3,4} | Silvia Tebar³ | Daniel Lozano^{1,2} | Alba Abras^{3,4,6} | Joaquim Gascón⁵ | Albert Picado^{5,7} | Carmen Muñoz^{4,8,9,#} | Faustino Torrico^{1,2,#} | Montserrat Gállego^{3,5,#}

¹ Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia

² Fundación CEADES y Medio Ambiente, Cochabamba, Bolivia

³ Secció de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau, Barcelona, Spain

⁵ Institut de Salut Global de Barcelona (ISGlobal), Barcelona, Spain

⁶ Laboratori d'Etologia Genètica, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Girona, Spain

⁷ Foundation for Innovative New Diagnostics (FINDI), Geneva, Switzerland

⁸ Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Barcelona, Barcelona, Spain

⁹ Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Correspondence

Mary Cruz Torrico, Facultad de Medicina, UMSS, Av. Aniceto Arce N° 371, Cochabamba, Bolivia.

Email: mary.torrico@umss.edu
Montserrat Gállego, Secció de Parasitologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Spain.
Email: mgallego@ub.edu

* Mary Cruz Torrico, Anna Fernández-Arévalo, and Cristina Ballart contributed equally to the work.

Carmen Muñoz, Faustino Torrico, and Montserrat Gállego should be considered as joint senior author.

Abstract

Leishmaniasis is caused by protozoans of the *Leishmania* genus, which includes more than 20 species capable of infecting humans worldwide. In the Americas, the most widespread species is *L. braziliensis*, present in 18 countries including Bolivia. The taxonomic position of the *L. braziliensis* complex has been a subject of controversy, complicated further by the recent identification of a particular subpopulation named *L. braziliensis* atypical or outlier. The aim of this study was to carry out a systematic analysis of the *L. braziliensis* complex in Bolivia and to describe the associated clinical characteristics. Forty-one strains were analyzed by sequencing an amplified 1245 bp fragment of the *hsp70* gene, which allowed its identification as: 24 (59%) *L. braziliensis*, 16 (39%) *L. braziliensis* outlier, and one (2%) *L. peruviana*. In a dendrogram constructed, *L. braziliensis* and *L. peruviana* are grouped in the same cluster, whilst *L. braziliensis* outlier appears in a separate branch. Sequence alignment allowed the identification of five non-polymorphic nucleotide positions (288, 297, 642, 993, and 1213) that discriminate

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2021 The Authors. *Transboundary and Emerging Diseases* published by Wiley-VCH GmbH

2242 | [wileyonlinelibrary.com/doi/10.1111/tbed](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed)

Transbound Emerg Dis. 2022;69:2242–2255.

L. braziliensis and *L. peruviana* from *L. braziliensis* outlier. Moreover, nucleotide positions 51 and 561 enable *L. peruviana* to be discriminated from the other two taxa. A greater diversity was observed in *L. braziliensis* outlier than in *L. braziliensis*-*L. peruviana*. The 41 strains came from 32 patients with tegumentary leishmaniasis, among which 22 patients (69%) presented cutaneous lesions (11 caused by *L. braziliensis* and 11 by *L. braziliensis* outlier) and 10 patients (31%) mucocutaneous lesions (eight caused by *L. braziliensis*, one by *L. braziliensis* outlier, and one by *L. peruviana*). Nine patients (28%) simultaneously provided two isolates, each from a separate lesion, and in each case the same genotype was identified in both. Treatment failure was observed in six patients infected with *L. braziliensis* and one patient with *L. peruviana*.

KEYWORDS

Bolivia, clinical characteristics, *Leishmania braziliensis* complex, response to treatment, sequencing *hsp70* gene, tegumentary human leishmaniasis

1 | INTRODUCTION

Leishmaniasis is caused by protozoans of the *Leishmania* genus, which includes more than 20 species capable of infecting humans worldwide. The parasites are transmitted to humans and vertebrate animals by phlebotomine sand flies (Organización Mundial de la Salud, 2021; Pan American Health Organization/World Health Organization, 2019a). The most extended species in the Americas is *L. braziliensis*, which is present in 18 countries (Pan American Health Organization/World Health Organization, 2019b). *Leishmania braziliensis* is widespread in areas of tropical forests, where it is transmitted in wild, peridomestic, and domestic cycles (Ballart et al., 2014; Campbell-Lendrum et al., 2001; Davies et al., 2000; Rojas et al., 2009). This specie is reported to cause tegumentary leishmaniasis (TL) in up to 90% of suspected cases (García et al., 2007; Teles et al., 2015). Although patients with TL can suffer simultaneously from localized cutaneous (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL), more frequently the skin lesions evolve to a destructive mucosal inflammation years after their first appearance and when the CL has apparently healed (Burza et al., 2018; Kevric et al., 2015; Reithinger & Dujardin, 2007). After treatment, mucosal lesions can leave mutilating and disfiguring sequelae and even be fatal due to associated infections (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, 2018; Pan American Health Organization/World Health Organization, 2019b). The other specie within the *L. braziliensis* complex, *L. peruviana*, is limited to regions of the inter-Andean valleys in Peru, and causes skin lesions, with rare affectation of the mucosa (Davies et al., 2000; Kato et al., 2019; Pérez et al., 2007).

The taxonomic position of the *L. braziliensis* complex has been a subject of controversy, *L. braziliensis* and *L. peruviana* being considered as variants of the same species or as two distinct species within the complex (Arana et al., 1990; Bañuls et al., 2000; Chouicha et al., 1997; Valdivia et al., 2015; Van der Auwera & Dujardin, 2015; Van den Broeck et al., 2020). Investigations carried out in Peru have reported the poly-

morphism of *L. braziliensis* complex, observing two genotypically different groups (groups 1 and 2), and *L. peruviana* has been included in group 1 (Van der Auwera et al., 2014). Other studies have identified hybrids of *L. braziliensis*/*L. peruviana* (Dujardin et al., 1995; Kato et al., 2019; Koarashi et al., 2016) that are capable of producing mucosal lesions (Nolder et al., 2007).

The application of different molecular tools, such as the amplified fragment length polymorphisms (AFLP) and the sequencing of a heat-shock protein *hsp70* gene fragment, has revealed high genetic diversity among isolates of the *L. braziliensis* complex and allowed the identification of a particular subpopulation named *L. braziliensis* atypical or outlier (Odiwuor et al., 2012; Van der Auwera et al., 2013). This subpopulation is apparently widespread in Latin America, being detected in Peru, Bolivia, and Panama (Fraga et al., 2013; Van der Auwera et al., 2016), although few clinical or epidemiological information has been described (Fraga et al., 2013). Previous studies have shown that *L. braziliensis* atypical or outlier strains exhibit a high degree of similarity (98.9-99.7%) for the *mpi*, *mdh*, *gpI* and *dogd* genes, with respect to the other isolates of *L. braziliensis*; however, it has several unique polymorphisms in the four genes (Tsukayama et al., 2009).

Considering the genetic variability of the *L. braziliensis* complex and the fact that atypical isolates of *L. braziliensis* have been reported in Bolivia, the aim of the present research was to carry out a systematic study of the complex in the Bolivian department of Cochabamba and identify atypical isolates of *L. braziliensis* by sequencing an *hsp70* gene fragment. Also, the clinical characteristics associated with the complex and the response to TL treatment were investigated. By updating the epidemiological situation of the disease, the results will help this pathology to be controlled in Bolivia.

1.1 | Study population

Thirty-two patients with cutaneous, mucosal, or mucocutaneous lesions, attending the Service of Dermatology of the Tropical Medicine

Center at the Faculty of Medicine, Universidad Mayor de San Simón (UMSS) (Cochabamba, Bolivia) from September 2014 to November 2015, were included. Those with suspected CL and MCL leishmaniasis were referred to the Parasitology laboratory service in the same center for the sample collection.

1.2 | Definitions

Clinical forms: Patients presenting only cutaneous lesions in any area of the body were classified as CL, and those with mucosal lesions in mouth and/or nostrils, or concomitant cutaneous and mucosal lesions, were classified as MCL.

Treatment failure: Patients who had a relapse due to treatment failure were identified from historical clinical data (Ballart et al., 2021). Treatment failures were considered as CL and MCL patients who had previously received a complete antileishmanial treatment in the past, regardless of its duration, and were not cured. In the case of MCL, patients presented an absent or incomplete scarring of lesion(s) and/or persistence of inflammation around the initial lesion, and/or clinical regression of a healed lesion and/or the presence of new mucosal lesion(s). In the case of CL, the previous treatment had to be directed to the same lesion(s) identified during our study.

1.3 | Leishmania isolation

Leishmania isolates were obtained by aspiration of the border of the lesions (Torrigo-Rojas & Zubieta-Durán, 2010) and cultured in TSTB media at 26–27°C (Bermúdez et al., 2005). Isolates were cryopreserved at –80°C in the laboratory of Parasitology at the UMSS in Bolivia and then sent to the Parasitology Laboratory at the University of Barcelona (UB), Spain. Promastigotes were recovered by thawing tubes containing isolates in a water bath at 37°C and cultured in parallel in NIN medium and Schneider's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 20% fetal bovine serum (Life Science Production) and 1% of sterile human urine. When the exponential growth stage was reached, cultures were washed with PBS, and the pellet resuspended in 1 mL of PBS to proceed with the DNA extraction.

1.4 | DNA extraction, amplification, purification and gene sequencing

DNA extraction was performed using the commercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) from 200 µL of culture in PBS that was treated with 20 µL of proteinase K following the manufacturer's instructions. The extracted DNA was eluted in 100 µL of AE buffer and stored at –20°C until use. Subsequently, the DNA was quantified in the EpochTMMulti-Volume Spectrophotometer System (BioTek) reader, and the extractions in which the DNA ratio 260/280 was equal to or less than 2 were processed.

The amplification of the 1245 bp *hsp70* gene was performed by using two PCRs that together cover this fragment: PCR-N (552 bp) and PCR-T (723 bp), according to a previously described protocol (Van der Auwera et al., 2013), with the following modifications: for each reaction were used 1 µM of buffer + MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 µM of primers F25 and R617 for PCR-N and 6F and R1310 for PCR-T, 1.5 U of DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific), 5 µL of the extraction product and sterile distilled water to adjust the final volume to 50 µL. The PCR products, together with a negative control, were assessed by 1% agarose gel electrophoresis, 0.5% TBE buffer and ethidium bromide at 100V for 45 min. The fragments were identified in comparison with the DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche).

Amplicons were enzymatically purified using ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Scientific), in a ratio of 2:5 (4 µL of ExoSAP in 10 µL amplified product). Double-strand DNA was sequenced by the Sanger method. The sequencing was carried out at the Scientific and Technologic Centers of the UB (Spain).

1.5 | Sequence alignment, identification and polymorphism analysis

The sequences obtained were analyzed and edited with the MEGA 7.0.26 program and submitted to the GenBank databases under the accession numbers MW507486–MW507526 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Minor errors, such as undefined or mismatched nucleotide positions, were manually corrected. Chromatogram positions with two overlapping nucleotide peaks were considered heterozygous and were corrected according to the IUPAC ambiguity codes (IUPAC, 2020). The alignment of the forward and reverse sequences of each fragment and the subsequent alignment of both fragments was performed with the SerialCloner 1.3.11 program to obtain the consensus sequence of the *hsp70* gene. To identify the strains sequenced, the BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) program was used, which compares the entered sequence with those published in the GenBank database, allowing its identification when regions of similarity are found and the statistical significance calculated.

Only the strains characterized within the *L. braziliensis* complex were taken into account for sequence alignment, population study and polymorphism analysis, in order to describe their genetic and phenotypic characteristics. The sequences obtained were analyzed together with additional sequences of 27 selected reference strains of the *L. braziliensis* complex (*L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis* outlier) and other New World species (*L. lainsoni*, *L. noiffi*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*) from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Supporting information Table S1) with the aim of evaluating the location of the studied *Leishmania* strains in the dendrogram. These reference strains were selected with the following criteria: they were published, covered at least 1245 bp of the *hsp70* gene, and were preferably isolated from humans in Bolivia or neighboring countries. Alignment was done with the ClustalW function of the MEGA 7.0.26 program. The ends of the sequences of the reference strains were trimmed to obtain a consensus length of 1245 bp of the *hsp70* gene in the studied Bolivian strains.

Dendrograms were built and the evolutionary relationship of the sequences was calculated using the Neighbor-joining statistical method. All nucleotides were duplicated in order not to lose the information of the heterozygous positions, and the clustering analysis was done using the MEGA 7.0.26 and BioNumerics 7.6.3 (Applied Maths) programs. As external group, a *Trypanosoma cruzi* sequence (KC960000.1) obtained from GenBank was added. The monophyletic groups were calculated with a bootstrap of 1000 replicates. Evolutionary distances were calculated using the p-distance method. In parallel, Neighbour-nets (NN) were constructed using SplitsTree version 4.14.8 software (Huson & Bryant, 2006) from hsp70 datasets using the uncorrected p-method and an equal angles representation.

Polymorphism analysis was carried out manually, identifying the nucleotide positions with variability between isolates, which allowed us to discriminate them at the species level and to identify differences in the nucleotide positions between species and sub-species within the *L. braziliensis* complex.

The genetic diversity of sequences and the diversity of haplotypes for the hsp70 gene were calculated using the program DnaSP version 5.10.01.

The clinical data collected were related to the typified species and sub-species.

1.6 | Ethical aspects

This research was carried out with isolates from patients with suspected TL attending the LABIMED, as part of a collaborative research project between ISGlobal (Barcelona, Spain) and CEADES Foundation (Cochabamba, Bolivia). The study protocol was approved by the Ethics Committees of the Hospital Clínic de Barcelona in Spain (HCB/2014/0582); CEADES Salud y Medio Ambiente and the Facultad de Medicina UMSS both in Bolivia. All suspected cases of leishmaniasis provided written informed consent (parents or guardians in case of patients under 18 years old) before participating to the study. All leishmaniasis suspects were diagnosed for free and CL and MCL confirmed cases were referred for treatment.

2 | RESULTS

2.1 | Identification of the *Leishmania braziliensis* complex

A total of 41 Bolivian strains of the *L. braziliensis* complex (obtained from 32 patients) were analyzed. On the basis of the BLAST results, 24 (59%) were identified as *L. braziliensis* and 16 (39%) as atypical forms of *L. braziliensis* (outlier). The percentage of similarity of these strains with respect to the GenBank reference strains was 99.76–100% (Table 1). One strain (MHOM/BO/2015/CUM-1372) presented the same percentage of similarity (99.92%) to both *L. peruviana* and *L. braziliensis* reference strains (LN907845.1, 1FR715987.1, respectively), but was characterized as *L. peruviana* because it is grouped with the reference

strains of *L. peruviana* (Figure 1, bootstrap value 54), and nucleotide positions 51 (A) and 561 (A) enable to distinguish *L. peruviana* from the other two taxa (Table 2).

2.2 | Population study

The dendrogram obtained with the alignment of the 68 sequences (41 strains of the present study, plus the 26 reference strains of *Leishmania* obtained from GenBank and one sequence of *T. cruzi* obtained from the GenBank used as external group) is shown in Figure 1. Two clusters are observed, one corresponding to the subgenus *Viannia* and the other to the sub-genus *Leishmania* (*L. mexicana* and *L. amazonensis* reference strains). Within the *Viannia* subgenus, the *L. lainsoni* strains are separate from the others in their own branch. The *Leishmania guyanensis* and *L. braziliensis* complexes bifurcate from the other branch. *L. braziliensis* and *L. peruviana* appear grouped in a cluster, whilst *L. braziliensis* outlier is grouped in a separate branch together with *L. naiffi* (bootstrap values of 98 and 70, respectively). In the branch of *L. peruviana*, the Bolivian strain CUM-1372 is found in a sub-branch together with a reference strain of *L. braziliensis*.

The Neighbor-net analysis identifies three distinct genetic clusters showing that *L. braziliensis* outlier is clearly separated from *L. braziliensis* and the presence of possible hybrids of *L. braziliensis/L. peruviana* (CUM 1343, CUM 1352) located between *L. braziliensis* and *L. peruviana* clusters (Figure 2).

2.3 | Polymorphism analysis

The alignment of the hsp70 gene fragment of 1245 bp allowed the identification of three species of the *L. braziliensis* complex: *L. braziliensis* (24 strains), *L. peruviana* (1 strain), and *L. braziliensis* outlier (16 strains), which differ in seven nucleotide positions (Table 2). Five non-polymorphic nucleotide positions (288, 297, 642, 993, and 1213) allow *L. braziliensis* outlier to be discriminated from *L. peruviana* and *L. braziliensis* and two others (51 and 561) allow to discriminate *L. peruviana*. This study revealed 16 genotypes (1–16) among the Bolivian strains (six genotypes of *L. braziliensis*, nine of *L. braziliensis* outlier, and one of *L. peruviana*), plus six different genotypes found among the reference strains (17R–22R) (two genotypes of *L. braziliensis*, three of *L. braziliensis* outlier, and one of *L. peruviana*).

Twenty-seven per cent of the strains ($n = 11$; 4/24 *L. braziliensis*, 1/1 *L. peruviana*, and 6/16 *L. braziliensis* outlier) showed heterozygosity in any of the nucleotide polymorphic positions analyzed. Traces of genetic exchange between *L. braziliensis* and *L. peruviana* were observed in some of the strains (genotypes 4, 5, 6).

The genetic diversity analysis of the hsp70 gene fragment performed by the DnaSP version 5.10.01 program, including the *L. braziliensis-L. peruviana* group and the *L. braziliensis* outlier sequences, showed four polymorphic sites and four mutations in both groups analyzed (Table 3). A greater genetic diversity ($Hd = 0.8$) and nucleotide diversity ($\pi = 0.00124$) were observed in *L. braziliensis* outlier compared to *L. braziliensis-L. peruviana*.

TABLE 1 Identification of Bolivian strains of the *Leishmania braziliensis* complex by *hsp70* gene sequencing

WHO CODE	GenBank reference strain	Accession Number GenBank	Coverage (% of identity)	Species Identification
MHOM/BO/2014/CUM-1272	MCAN/PE/91/AEM222	FR715991.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2014/CUM-1275 ¹	MHOM/BR/75/M2904	LS997627.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1276 ²	MHOM/BR/75/M2904	FR799003.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1279	MHOM/PE/02/LH2182	FN395040.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1281 ³	MHOM/BR/75/M2904	FR799003.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1282 ²	MHOM/BR/75/M2904	FR799003.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1284	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1286	MHOM/BO/-/CUM180	FN395039.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1288 ³	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1289 ³	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2014/CUM-1292	MHOM/BR/75/M2904	LS997627.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1293	MHOM/PE/-/LH3851	FR872763.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1294 ⁴	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1243/1245 (99.84%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1297	MHOM/PE/02/LH2182	FN395040.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1298	MHOM/BR/75/M2904	FR799003.1	1242/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1307	MHOM/BO/-/CUM180	FN395039.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1309 ⁴	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1242/1245 (99.76%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1313 ⁵	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1242/1245 (99.76%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1314 ⁵	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1242/1245 (99.76%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1318	MHOM/BR/75/M2904	FR799003.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1319	MCAN/PE/91/AEM222	FR715991.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1320 ⁶	MHOM/BR/75/M2904	FR799003.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1321 ⁴	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1330	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1339 ⁷	MHOM/BR/75/M2904	FR799003.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1343 ⁷	MHOM/BO/-/CUM68	FR872758.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1347	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1352	MHOM/BO/-/CUM68	FR872758.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1355	MHOM/BO/-/CUM555	FR872760.1	1243/1245 (99.84%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1361	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1362 ⁸	MHOM/PE/-/LH3851	FR872763.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1364	MCAN/PE/91/AEM222	FR715991.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1365	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1366	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1367 ⁹	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1243/1245 (99.84%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1368 ⁹	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1370 ⁸	MCAN/PE/91/AEM222	FR715991.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1372	MHOM/PE/01/PER006/1	FR715987.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. peruviana</i>
	MHOM/PE/1990/HB86	LN907845.1	1244/1245 (99.92%)	
MHOM/BO/2015/CUM-1373	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i>
MHOM/BO/2015/CUM-1374	MHOM/PE/03/PER163/0	FR715990.1	1244/1245 (99.92%)	<i>L. braziliensis</i> outlier
MHOM/BO/2015/CUM-1376	IWHI/BR/86/M10187	HF586369.1	1245/1245 (100%)	<i>L. braziliensis</i>

The isolates from the same patient (nine patients with more than one isolate) are marked with a superscript 1,2,3,4, ... 9 in the WHO code of the strain.

© 2013, 2014. Downloaded from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.12291> by Institut Pasteur - Institut, Wiley Online Library on [02/02/2015]. See the Terms and Conditions (<http://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

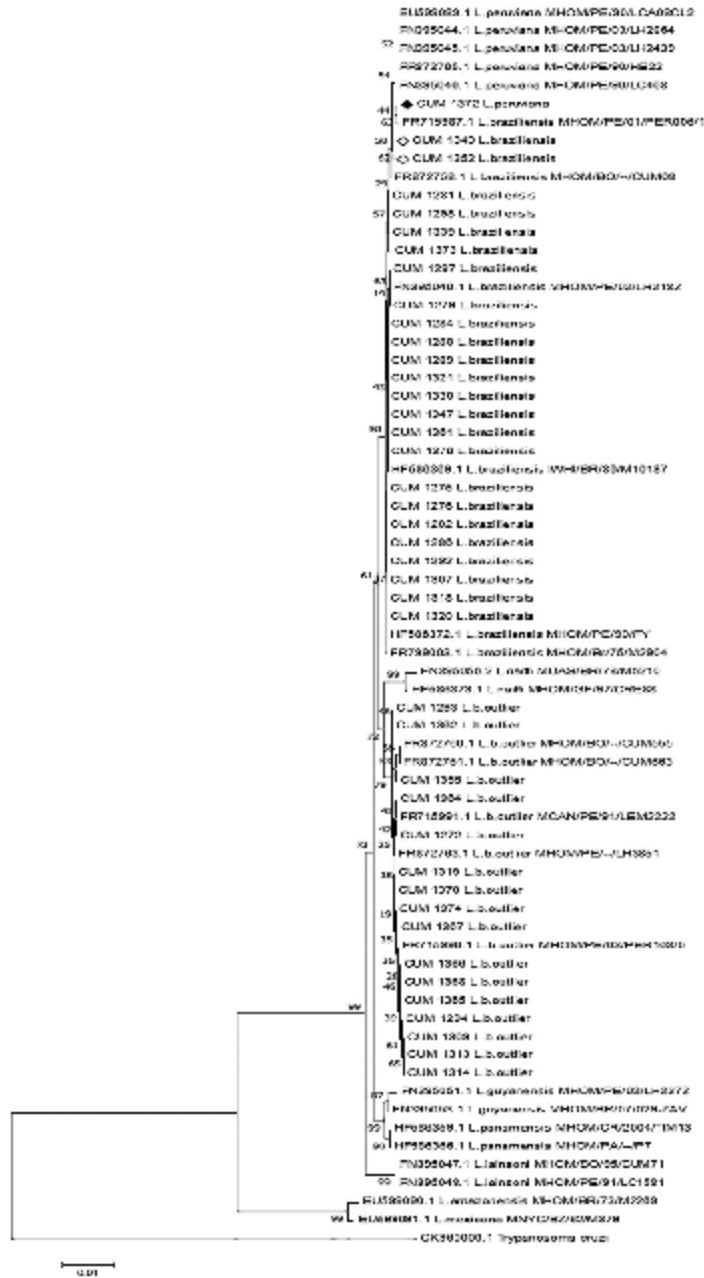


FIGURE 1 Neighbor-joining tree based on the *hsp70* gene sequences. The bootstrap values are represented in the nodes. The bottom scale represents the proportional distance to the differences between the alignments.
 ◆ *L. peruviana* strain identified in the study with genetic profile of *L. peruviana* and *L. braziliensis*.
 ◇ Strains identified in the study as possible *L. braziliensis*-*L. peruviana* hybrids

RECEIVED 2012, Accepted 2012, Published online 2012, DOI: 10.1111/j.1365-3113.2012.04811.x

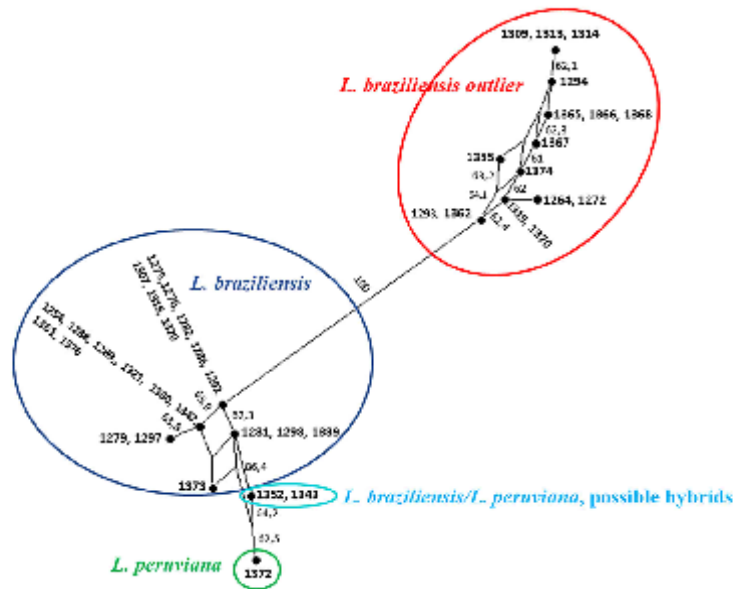


FIGURE 2 Genetic distance evaluation of *hsp70* by Neighbor-net (NN) in *Leishmania braziliensis* complex. Bootstrap values (1000 replicates) are shown on the edges (percentages)

TABLE 4 *Leishmania braziliensis* complex strains analyzed and their relationship with clinical characteristics

Species	N° of isolates	N° of patients	N° lesion per patient	Patients with CL	Patients with MCL	Patient with treatment failure
<i>L. braziliensis</i>	24	19	1–6	11	8	6*
<i>L. peruviana</i>	1	1	1	0	1	1
<i>L. braziliensis</i> outlier	16	12	1–3	11	1	0
Total	41	32	—	22	10	7

CL, cutaneous leishmaniasis; MCL, mucocutaneous leishmaniasis.

*Four patients with localized cutaneous lesions and two patients with mucocutaneous lesions.

not remember the time of onset, or did not the one patient with chronic mucosal lesions. The *L. peruviana* strain was isolated from a patient suffering from mucosal lesions and with treatment failure (CUM-1372).

The CUM-1372 strain, which was identified as *L. peruviana*, was isolated from a 71-year-old male patient living in Puerto Zudañas (Chapare province, Cochabamba), who had two scars, one on the face and one on an upper limb, and active lesions in the nostrils. The patient referred that the skin lesions were active approximately 5 years ago (around 2010) and were healed with one or two ampoules of meglumine antimoniate (Glucantime®) purchased from local pharmacies and applied repeatedly. In addition, the patient reported that in 2010 he already had mucosal lesions, and in 2015 he traveled to the city of Cochabamba to request medical attention being confirmed the diagnosis of MCL in our laboratory. He first received a complete treatment

with Glucantime® but did not improve. After several months, he was hospitalized for 3 months to receive a complete treatment with amphotericin B, which led to an apparently complete recovery. In 2015, the mucosal lesions reactivated and he returned to Cochabamba to receive another full treatment with amphotericin B.

3 | DISCUSSION

3.1 | Identification of the *Leishmania braziliensis* complex and polymorphism analysis

Several techniques (biochemical, molecular, and proteomic) have been used to identify the *Leishmania* species, responsible for different clinical

1620193, 2023, 4, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.14238 by PAUJIBIBI/UCR, Institute of Cardiology, Wiley Online Library on [05/07/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

forms of leishmaniasis around the world (Akhoundi et al., 2017; Arana et al., 1990; Lachaud et al., 2017; Van der Auwera et al., 2013, 2014). PCR and sequencing of conserved gene amplified products are currently widely employed. The genes encoding the *hsp70* proteins were among the first to be used in kinetoplastid characterization, as they are highly conserved and present in various copies in tandem (Folgueira et al., 2007). They have been useful for phylogenetic and taxonomic studies of *Leishmania* in both the New and Old Worlds (Conter et al., 2019; Odiwuor et al., 2012; Van der Auwera & Dujardin, 2015; Van der Auwera et al., 2013) and have proved to be suitable and sensitive targets for the typing of neotropical *Leishmania* species from tissues (García et al., 2004) giving reproducible results.

In the present study, PCR and sequencing of a 1245 bp amplified fragment of the *hsp70* gene allowed the phylogenetic analysis of *L. braziliensis* complex strains isolated in Bolivia, as already carried out in other countries in Latin America (Fraga et al., 2010; Van der Auwera & Dujardin, 2015; Van der Auwera et al., 2014). The analysis showed the presence of *L. braziliensis*, *L. peruviana*, and *L. braziliensis* outlier. The identification of *L. braziliensis* outlier has epidemiological and clinical relevance, as no systematic studies of this type with TL-causing *Leishmania* strains have been carried out previously in Bolivia, or in other Latin American countries. This, despite the fact that several authors have reported atypical species in Peru, Panama, and Bolivia (Fraga et al., 2013; Odiwuor et al., 2012) named as "atypical *L. braziliensis*" (Fraga et al., 2013), "*L. braziliensis* type 2" (Van der Auwera et al., 2014), "*L. braziliensis* type 3" (Odiwuor et al., 2012) and "*L. braziliensis* outlier" (Van der Auwera et al., 2013). Indeed, there is not yet a consensus in their taxonomic name neither position, despite being more prevalent and easier to discriminate than *L. peruviana*. A more detailed phylogenetic study is needed to clarify its taxonomic status (Van der Auwera et al., 2015).

Based on the findings of this study regarding *L. peruviana*, the reference strain MHOM/PE/01/PER006/1 (= MHOM/PE/01/LH2140), characterized as *L. braziliensis* FR715987.1 (Adaui et al., 2011), may also belong to *L. peruviana* (genotype 19R of our study). In fact, this reference strain is reported to have mixed alleles from both species, clustering with *L. peruviana* in some studies and with *L. braziliensis* in others (Odiwuor et al., 2012; Van der Auwera et al., 2013).

This study as well demonstrated the genetic diversity of the *hsp70* gene among the *L. braziliensis* complex which is divided into two clearly differentiated clusters, the so-called *L. braziliensis* "outlier", and the second corresponds to *L. braziliensis*, where the Bolivian and reference strains of *L. peruviana* are also located. Similar results have been obtained in studies using AFLP of the *hsp70* gene or MLST analysis of four markers (*hsp70* gene, 7SLRNA gene, rDNA ITS 1 and minixon) (Odiwuor et al., 2012; Van der Auwera et al., 2014). However, in some cases, despite clustering separately, *L. braziliensis* outlier and *L. braziliensis* were considered to be sister clades, *L. peruviana* being grouped with the latter (Van der Auwera et al., 2013).

L. braziliensis is known to be the predecessor of *L. peruviana*, which evolved in adaptation to the different ecosystem in Peru (Dujardin et al., 1995), with hybrids of *L. braziliensis*/*L. peruviana* being reported (Kato et al., 2014; 2019; Nolder et al., 2007; Odiwuor et al., 2012).

However, nothing is known about the evolution of *L. braziliensis* outlier. The genetic diversity index showed that *L. braziliensis* outlier has greater diversity than *L. braziliensis*, these data supporting that *L. braziliensis* outlier diverges from *L. braziliensis*, which can also be observed in both the Neighbor-joining dendrogram, and in the Neighbor-Net analysis.

A geographical origin could be ruled out, as *L. braziliensis* and *L. braziliensis* outlier are both widely distributed in Latin America, namely in Peru, Panama and Bolivia (Fraga et al., 2013), and it seems that the two groups of parasites are sympatric. Due to parasites included in this study were isolated during two consecutive years, the identified genotypes existed simultaneously and the possibility of a time bias can be excluded (Odiwuor et al., 2012).

The finding of 16 genotypes within the *L. braziliensis* complex, indicates a high degree of polymorphism in the *hsp70* gene, especially among *L. braziliensis* outlier strains. Four types of ambiguities were identified (R, Y, K, M), with up to three ambiguities in the strains from genotype 6 (CUM-1343 and CUM-1352) corresponding to possible hybrids of *L. braziliensis*/*L. peruviana*. This finding is clinically relevant because hybrids can potentially cause mucosal leishmaniasis (Nolder et al., 2007). In our study, only the CUM-1343 strain was associated with a chronic mucocutaneous lesion with evolution time unknown (> 12 months), whereas the CUM-1352 strain was associated with skin lesion with three months of evolution. None of these two strains responded to the treatment with meglumine antimoniate (Glucantime®).

A previous investigation carried out with isolates from Peru, Panama and Bolivia, based on the analysis of a 1380 bp sequence of the *hsp70* gene, also showed ambiguities: up to four in group 1 (*L. braziliensis*) and group 3 (*L. braziliensis* atypical), and as many as seven in intermediate isolates between group 1 and 3 (Odiwuor et al., 2012), which may be due to *L. braziliensis*/*L. braziliensis* outlier hybrids (Van der Auwera et al., 2013). The presence of numerous ambiguities could be related to genetic recombination on events among parasite populations, as shown in a study of the *L. braziliensis* complex, or to genetic exchange, as demonstrated in *L. donovani* (Boité et al., 2012; Fernández-Arévalo et al., 2020; Lukeš et al., 2007). The presence of *L. braziliensis* outlier with three nucleotide ambiguities suggest low level of genetic recombination in the strains circulating in Bolivia or possibly dual and occasional sexual reproduction (Cupolillo et al., 1998). The sequencing analysis of four genes (*mpi*, *mdh*, *gpi*, and *δpgd*) with atypical patterns in MLEE, has allowed the characterization of New World *Leishmania* species. Moreover, as a high number of single nucleotide polymorphisms in these genes are found on different chromosomes, it is thought that the variation is distributed throughout the genome, indicating that the divergence of this group of atypical parasites did not occur recently (Tsukayama et al., 2009).

On the other hand, the CUM-1372 strain (identified as *L. peruviana*) presented a single ambiguity (Y) in position 978, which is the only difference with the sequences of the *L. peruviana* reference strains used in this study. Thus, this could represent the first report of *L. peruviana* in Bolivia, or a possible hybrid of *L. braziliensis*/*L. peruviana*, as it has the genetic profile of both species.

A previous study with complete genome sequencing including 67 strains of the *L. braziliensis* complex from Peru suggested that deforestation in the last 150,000 years has influenced the speciation and diversity of parasites, and whole genome analysis demonstrated a meiotic-like recombination between Andean and Amazonian *Leishmania* species, resulting in a full-genome hybrid (Van den Broeck et al., 2020). The identification of possible hybrids in Bolivia is therefore another reason to suspect that *L. peruviana* could also be circulating in this country.

3.2 | Clinical characteristics of Bolivian *Leishmania braziliensis* complex strains

The *L. braziliensis* complex was identified as responsible for TL in 85.4% of the isolates obtained in the region of Cochabamba in Bolivia. Our results agree with those described in other endemic areas of TL in Bolivia, such as 93% in Chapare, as well department of Cochabamba, and 65.5% in the department of La Paz (Bilbao-Ramos et al., 2017). Similar results have been obtained in other Latin American countries (Davies et al., 2000; Montalvo et al., 2016; Teles et al., 2015).

In our study 28% of patients presented chronic mucosal lesions with more than 12 months of evolution and involvement of the oral and nasal mucosa: one patient by *L. braziliensis* outlier, one by *L. peruviana* and seven by *L. braziliensis*. According to previous reports, from 1 to 10% of skin lesions caused by *L. braziliensis* tend to develop serious and disfiguring mucocutaneous lesions, and can even lead to pneumonia (Burza et al., 2018; Pan American Health Organization/World Health Organization, 2019b).

In the present study, *L. braziliensis* outlier was isolated from skin lesions more frequently (87.5%). Two strains of *L. braziliensis* outlier were isolated simultaneously from chronic mucosal lesions (oral and nasal > 12 months of evolution) corresponding to the same patient. So far, few publications have described the clinical and epidemiological characteristics of infections with *L. braziliensis* outlier in other countries; it has been isolated from patients with skin lesions (Odiwuor et al., 2012), whereas in a study that typified five strains as *L. braziliensis* outlier, three were obtained from mucocutaneous lesions and two from skin lesions (Tsukayama et al., 2009). In addition, hybrids of *L. braziliensis*/*L. braziliensis* outlier have also been reported, but without a description of the clinical lesions (Van der Auwera et al., 2013).

We identified *L. peruviana* in a patient with mucosal lesions in Bolivia without a history of traveling to Peru, and who works in agriculture in the Chapare region (Cochabamba). The distribution of *L. peruviana* was thought to be restricted to endemic areas in the rural Andean and inter-Andean valleys of Peru (between 1000 and 3000 m above sea level) (Arevalo et al., 2007; Koarashi et al., 2016; Kato et al., 2019; Lucas et al., 1998), but it has also been reported from a lowland area and other ecoregions of Peru including the Amazonian jungle (Arevalo et al., 2007). *L. peruviana* usually causes a benign form of cutaneous leishmaniasis known as uta (Laison & Shaw, 1987; Van den Broeck et al., 2020), but cases of mucosal and disseminated leishmaniasis associated with this species have been reported (Espinoza-Morales

et al., 2017; Lucas et al., 1998; Organización Mundial de la Salud, 2010).

In a study using hsp70 PCR-RFLP, a Bolivian *L. braziliensis* strain isolated from a mucocutaneous lesion (CUM-29, FN395041) also showed an *L. peruviana* profile (Montalvo et al., 2010). Therefore, the authors considered that more intra-species studies with a higher number of isolates of the *L. braziliensis* complex need to be carried out to explain this behavior. In addition, we identified possible hybrids of *L. braziliensis*/*L. peruviana* (CUM-1343 and CUM-1352), which are also suspected in Colombia (Montalvo et al., 2016). Hybrids of *L. braziliensis*/*L. peruviana* have been identified in humans, dogs and sand flies in Huánuco, Peru, where both species are endemic, and are potentially causative of mucosal lesions (Dujardin et al., 1995; Kato et al., 2016; Nolder et al., 2007). Likewise, the hybridization of strains could have clinical implications related to the behavior of the parasite, adaptation to the vector and response to treatment (Hamad et al., 2011).

In Bolivia, leishmaniasis is generally treated with meglumine antimoniate for skin lesions and amphotericin B for mucosal lesions; miltefosine, ketoconazole and itraconazole, among others, are also used with variable results (Ministerio de Salud de Bolivia, 2015). In our study, 22% of the patients infected with the *L. braziliensis* complex presented treatment failure; six patients infected with *L. braziliensis* failed to respond to meglumine antimoniate, whereas only the single patient infected with *L. peruviana* did not improve with amphotericin B. Previous studies in Bolivia reported treatment failure with pentavalent antimonials, miltefosine and even amphotericin B deoxycholate, resulting in the use of combined treatment strategies (Rojas Cabrera et al., 2017) or perilesional treatment (Rojas Cabrera et al., 2019).

Another study in Brazil found an effectiveness of 53.8% in patients infected with *L. braziliensis* treated with meglumine antimoniate whereas a study in Peru reported therapeutic failure in 30.4% of patients infected with *L. braziliensis* and 24.5% for *L. peruviana* (Arevalo et al., 2007). Likewise, it was reported that lesions <5 weeks of evolution, multiple lesions and infection by *L. braziliensis* have the highest risk of therapy failure with sodium stibogluconate (Pentostan®) (Llanos-Cuentas et al., 2008). Comparing these results with ours with meglumine antimoniate, similarities can be observed in the group: multiple lesions (in our study, two and three), chronic evolution (>8 weeks) and the species, as all were typified as *L. braziliensis sensu stricto*.

In our sample, none of the patients infected with *L. braziliensis* outlier presented treatment failure during the time of study including the patient with mucosal lesions. There are no scientific reports referring to the clinical and epidemiological characteristics of *L. braziliensis* outlier infection, possibly because the typing techniques routinely used cannot discriminate the species within the *L. braziliensis* complex (Odiwuor et al., 2012). Thus, more molecular studies on species discrimination and their clinical and epidemiological relevance are required (Tsukayama et al., 2009).

An important observation in our study, not previously reported in Latin America, is that a patient with chronic mucosal lesions (isolate CUM-1372, *L. peruviana*) failed to respond to treatment with both meglumine antimoniate and amphotericin B deoxycholate. Amphotericin B is not usually recommended due to its toxicity (renal, hepatic, etc.), and

is only used as an alternative in cases of treatment failure with first-line drugs or in special situations (Organización Panamericana de la Salud, 2013; Rodríguez Galvis et al., 2020). Treatment failure is known to be more likely in mucosal lesions (Ministerio de Salud de Bolivia, 2015), possibly because this clinical manifestation is related to the immunocompromised status of the patient (perhaps due to difficulty in feeding), a factor that could contribute to the severity of the infection as well as the treatment failure of amphotericin B (Nweze et al., 2020; Van Griensven et al., 2014).

In conclusion, this first systematic genetic analysis of *L. braziliensis* complex isolates from Bolivia has revealed the presence of all the species, *L. braziliensis*, *L. braziliensis* outlier *L. peruviana*, at least in the department of Cochabamba. Regarding their associated clinical characteristics, *L. braziliensis* outlier was frequently isolated in skin lesions, in one case with mucosal involvement. Unlike *L. braziliensis*, no phenotype of treatment failure was observed for infection with this atypical species. The study of populations and the analysis of polymorphisms showed that both groups presented nucleotide ambiguities indicative of genetic recombination processes. In addition, the detection of nucleotide positions allowed groups of the complex to be differentiated. This study demonstrates the feasibility of performing similar interventions that are required in other endemic areas in Bolivia. Also, emphasize the relevance of determining the genetic characteristics, geographical distribution and clinical impact of the *L. braziliensis* complex in order to obtain more knowledge about the epidemiology of TL and its control.

ACKNOWLEDGMENTS

The work carried out in Bolivia was supported by AECID (14-CO-1-558). The participating UB and ISGlobal investigators are part of the GREPIMER group (Grup de Recerca en Patologia Importada i Malalties Emergents i Re-emergents), which received support from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR, 2014 SGR 26 and 2017 SGR 924). ISGlobal receives support from the Tropical Disease Cooperative Research Network (RICET) (RD12/0018/0010) and the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities through the "Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019-2023" Program (CEX2018-000806-S). ISGlobal is a member of the Centres de Recerca de Catalunya (CERCA) Programme, Government of Catalonia (Spain).

The authors would like to thank all the staff of LABIMED and IIBISMED for their support in the study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS STATEMENT

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Sequence data are available in GenBank under the accession numbers MW507486–MW507526

ORCID

Mary Cruz Torrico <https://orcid.org/0000-0001-5478-4881>

Anna Fernández-Arévalo <https://orcid.org/0000-0003-4925-7184>

REFERENCES

- Adau, V., Castillo, D., Zimic, M., Gutierrez, A., Decuyper, S., Vanaerschot, M., De Donckler, S., Schnorbusch, K., Maes, L., Van Der Auwera, G., Maes, L., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, J., & Dujardin, J. C. (2011). Comparative gene expression analysis throughout the life cycle of *Leishmania braziliensis*: Diversity of expression profiles among clinical isolates. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), e1021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001021>
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpková, 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(3), 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- Araña, M., Evans, D. A., Zolles, A. L., Llanos Cuentas, A., & Arevalo, J. (1990). Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(4), 526–529. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90025-A](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90025-A)
- Arevalo, J., Ramirez, L., Adau, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., De Donckler, S., Maurer, A., Chappuis, F., Dujardin, J. C., & Llanos-Cuentas, A. (2007). Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 195(12), 1846–1851. <https://doi.org/10.1093/infdis/jni141>
- Ballart, C., Torrico, M. C., Vidal, G., Torrico, F., Lozano, D., Gállego, M., Pinto, L., Rojas, E., Aguilar, R., Dobaño, C., Ares-Gomez, S. S., & Picado, A. (2021). Clinical and Immunological characteristics of tegumentary leishmaniasis cases in Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009223>
- Ballart, C., Vidal, G., Picado, A., Cortez, M. R., Torrico, F., Torrico, M. C., Godoy, R., Lozano, D., & Gállego, M. (2016). Intradomiciliary and peridomiciliary captures of sand flies (Diptera: Phlebotomidae) in the leishmaniasis endemic area of Chapare province, tropic of Cochabamba, Bolivia. *Acta Tropica*, 154, 121–124. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.007>
- Bañuls, A. L., Dujardin, J. C., Guernini, F., De Donckler, S., Jacquet, D., Arevalo, J., Noel, S., Le Ray, D., & Tibayrenc, M. (2000). Is *Leishmania (Viannia) peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD Evolutionary Genetics Answer. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(3), 197–207. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00039.x>
- Bermúdez, H., Solano, M., Torrico-Rojas, M. C., Carballo-Montero, M., Lafuente-Covarrubias, O., Lara-Arias, M. P., & Paredes-Torrico, P. (2005). Diagnóstico de Leishmaniasis Utilizando Medio de Cultivo TSTB en Pacientes del Trópico de Cochabamba. *Gaceta Médica Boliviana*, 28(2), 31–35. Retrieved on January 18, 2020, from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=51012-2966200500200006&lng=es&tlng=es
- Billbao-Ramos, P., Dea-Ayuela, M. A., Cardenas-Algría, O., Salamanca, E., Santalla-Vargas, J., Benito, C., Flores, N., & Bolás-Fernández, F. (2017). Leishmaniasis in the major endemic region of plurinational State of Bolivia: Species identification, phylogeography and drug susceptibility implications. *Acta Tropica*, 176, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.026>
- Bolté, M., Mauricio, I., Miles, M., & Cupolillo, E. (2012). New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania (Viannia)* parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1888. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001888>
- Burza, S., Croft, S., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

- Campbell-Lendrum, D., Dujardin, J. P., Martinez, E., Feliciangeli, M. D., Perez, J. E., Passerat De Silans, L. N. M., & Desjeux, P. (2001). Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: Changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(2), 159–162. <https://doi.org/10.1590/S007402762001000200004>
- Chouicha, N., Lanotte, G., Pratlong, F., Cuba Cuba, C. A., Velez, I. D., & Dedet, J. P. (1997). Phylogenetic taxonomy of *Leishmania* (*Vannia*) *brasilensis* based on isoenzymatic study of 137 isolates. *Parasitology*, 115(4), 343–348. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001376>
- Conter, C., Mota, C., Andreo dos Santos, B., de Souza Braga, L., De Souza Terron, M., Rocha Navascon, T., Bekner Silva Fernandes, A., Galhardo Demarchi, I., Reinhold de Castro, K., Alessi Aristides, S., Campana Lonardon, I. M., Vieira Teixeira, J., & Verzignassi Silveira, T. (2019). PCR primers designed for new world *Leishmania*: A systematic review. *Experimental Parasitology*, 207, 107773. <https://doi.org/10.1016/j.expara.2019.107773>
- Cupollillo, E., Momen, H., & Grimaldi, G., Jr. (1998). Genetic diversity in natural populations of new world *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 663–668. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276199800500018>
- Davies, C. R., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R., & Rodriguez, N. (2000). The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Gacetas de Saúde Pública*, 16(4), 925–950. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2000000400013>
- Den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., Roux, A. F., Smith, T., Antonarakis, S. E., & Taschner, P. E. (2016). HGVs Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation*, 37(6), 564–569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- Dujardin, J. C., Bafalis, A. L., Llanos-Cuentas, A., Alvarez, E., De Doncker, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Arévalo, J., & Tibayrenc, M. (1995). Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica*, 59(4), 293–307. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(95\)00094-U](https://doi.org/10.1016/0001-706X(95)00094-U)
- Espinoza-Morales, D., Lucchetti Rodríguez, A., Silva-Caso, W., Suarez-Ogñio, L., Pons, M. J., & Del Valle-Mendoza, J. (2017). An atypical case of disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania peruviana* in the valleys of Ancash-Peru. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(11), 1101–1103. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.001>
- Fernández-Arévalo, A., El Baldouri, F., Ravel, C., Ballart, C., Abras, A., Lachaud, L., Tebar, S., Lami, P., Pratlong, F., Gállego, M., & Muñoz, C. (2020). The *Leishmania donovani* species complex: A new insight into taxonomy. *International Journal for Parasitology*, 50(13), 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.013>
- Folgueira, C., Cañavate, C., Chicharro, C., & Requena, J. M. (2007). Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology*, 134(3), 369–377. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001570>
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
- Fraga, J., Montalvo, A. M., Maes, L., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2013). HindIII and SmaI digests of heat-shock protein 70 PCR for *Leishmania* typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 245–247. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.023>
- García, A. L., Parrado, R., De Doncker, S., Bermudez, H., & Dujardin, J. C. (2007). American tegumentary leishmaniasis: Direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 368–371. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.06.009>
- García, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arévalo, J., Wilder Quispe Tintaya, K., & Dujardin, J. C. (2004). Culture-independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>
- García, L., Kindt, A., Bermúdez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arévalo, J., Quispe, K., & Dujardin, J. C. (2004). Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>
- Hamad, S. H., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., Abebe, T., Younis, B. M., Elthair, M. E. E., El-Hassan, A. M., Hailu, A., & Bart, A. (2011). *Leishmania*: Probable genetic hybrids between species in Sudanese isolates. *Journal of Microbiology and Antimicrobial*, 3(6), 142–145.
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 254–267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- IUPAC. (2020). IUPAC ambiguity codes. Nucleotide ambiguity code. Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences. Retrieved from: <https://www.dnabases.com/articles/IUPAC%2Fambiguity%2Fcodes.html>
- Kato, H., Cáceres, A. G., & Hashiguchi, Y. (2016). First Evidence of a Hybrid of *Leishmania* (*Vannia*) *brasilensis*/L. (*V.*) *peruviana* DNA detected from the Phlebotomine sand fly *Lutzomyia tajadai* in Peru. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004336>
- Kato, H., Cáceres, A. G., Seki, C., Sillipú García, C. R., Holguín Mauricci, C., Castro Martínez, S. C., Moreno Palao, D., Castro Muniz, J. L., Troyes Rivera, L. D., Villegas Briones, Z. I., Guerrero Quinchó, S., Sulca Jayo, G. L., Tineo Villafuerte, E., Manrique de Lara Estrada, C., Arias, F. R., Passara, F. S., Ruelas Llerena, N., Kubo, M., Tabbabi, A., ... Hashiguchi, Y. (2019). Further insight into the geographic distribution of *Leishmania* species in Peru by cytochrome b and mannose phosphate isomerase gene analyses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007496. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007496>
- Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. (2015). New world and old world leishmaniasis infection: A practical review. *Dermatologic Clinics*, 33(3), 579–593. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>
- Kozaishi, Y., Cáceres, A. G., Saca, F. M. Z., Flores, E. E. P., Trujillo, A. C., Alvarez, J. L. A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Katakura, K., Hashiguchi, Y., & Kato, H. (2016). Identification of causative *Leishmania* species in Giemsa-stained smears prepared from patients with cutaneous leishmaniasis in Peru using PCR-RFLP. *Acta Tropica*, 158, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.024>
- Lachaud, L., Fernández-Arévalo, A., Normand, A. C., Lami, P., Nabet, C., Donnadieu, J. L., Piarroux, M., Djenad, F., Cassagne, C., Ravel, C., Tebar, S., Llovet, T., Blanchet, D., Demar, M., Harat, Z., Aoun, K., Bastien, P., Muñoz, C., Gállego, M., & Piarroux, R. (2017). Identification of *Leishmania* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a free web-based application and a dedicated mass-spectral library. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(10), 2924–2933. <https://doi.org/10.1128/JCM.00845-17>
- Lalson, R., & Shaw, J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In W. Peters & R. Killick-Kendrick (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* (Vol. 1). London: Academic Press Inc., pp. 1–120. Retrieved from: <https://patua.lec.gov.br/handle/lec/2715?locale=attribute-es>
- Llanos-Cuentas, A., Tuillano, G., Araujo-Castillo, R., Miranda-Verastegui, C., Santamaría-Castrellon, G., Ramirez, L., Lazo, M., De Doncker, S., Boelaert, M., Robays, J., Dujardin, J. C., Arévalo, J., & Chappuis, F. (2008). Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 223–231. <https://doi.org/10.1086/524042>
- Lucas, C. M., Franke, E. D., Cachay, M. I., Tejada, A., Cruz, M. E., Kreutzer, R. D., Barker, D. C., McCann, S. H. E., & Watts, D. M. (1998). Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(2), 312–317. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.312>

- Lukeš, J., Mauricio, I. L., Schönian, G., Dujardin, J. C., Soteriadiou, K., Dedet, J. P., Kuhls, K., Tintaya, Q. K. W., Jirků, M., Chodolová, E., Haralambos, C., Pratlong, F., Obornik, M., Horák, A., Ayala, F. J., & Miles, M. A. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9375–9380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703678104>
- Ministerio de Salud de Bolivia. (2015). Norma Nacional y Manual de Procedimientos Técnicos de Leishmaniasis, 365. Retrieved from: https://www.minsalud.gob.bo/images/Documentacion/dgss/Epidemiologia/Leishmaniasis/365-Norma_Nacional_y_Manual_de_Procedimientos_Tcnicos_de_Leishmaniasis-2015.pdf
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Montano, I., Monzote, L., Van der Auwera, G., Marín, M., & Muskus, C. (2016). Identificación molecular con base en el gen *hsp70* de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia. *Biomedica*, 36(Supl.1), 37–44. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688>
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van Der Auwera, G. (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*, 137(8), 1159–1168. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000089>
- Nolder, D., Roncal, N., Davies, C., Llano-S-Cuentas, A., & Miles, M. A. (2007). Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Vannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3), 573–578. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.573>
- Nwze, J. A., Nwze, E. I., & Onoja, U. S. (2020). Nutrition, malnutrition, and leishmaniasis. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 73, 1107–12. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.11.072>
- Odiwoor, S., Veland, N., Maes, I., Arévalo, J., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2012). Evolution of the *Leishmania braziliensis* species complex from amplified fragment length polymorphisms, and clinical implications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1994–2002. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.028>
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Control de la leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. Serie de Informes Técnicos 949. Retrieved from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Organización Mundial de la Salud. (2021). Leishmaniasis. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Organización Panamericana de la Salud. (2013). Leishmaniasis en las Américas: Recomendaciones para el tratamiento. Washington, DC. Retrieved from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/7704>
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. (2018). Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de las Américas, 6. Retrieved from: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34858/LeishReport6_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Pan American Health Organization/World Health Organization. (2019a). Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas, 8. Retrieved from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51734/leishreport8_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Pan American Health Organization/World Health Organization. (2019b). Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas. Retrieved from <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838>
- Pérez, J. E., Veland, N., Espinosa, D., Torres, K., Ogasaku, E., Ulanos-Cuentas, A., Gamboa, D., & Arévalo, J. (2007). Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Vannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(5), 655–658. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000500077>
- Reithinger, R., & Dujardin, J. C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 21–25. <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>
- Rodríguez Galvis, M. C., Pérez Franco, J. E., Casas Vargas, M. Y., & Ordoñez Rubiano, M. F. (2020). Effectiveness and safety of amphotericin B deoxycholate, amphotericin B colloidal dispersion, and liposomal amphotericin B as third-line treatments for cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A retrospective study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2), 274–279. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0514>
- Rojas, E., Parrado, R., Delgado, R., Reithinger, R., & García, A. L. (2009). Leishmaniasis in Chaparé, Bolivia. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 678–680. <https://doi.org/10.1002/eid22184>
- Rojas Cabrera, E., Paz, D., Verduguez-Orellana, A., Córdova Rojas, M., & Guzmán-Rivero, J. M. (2017). Tratamiento combinado de Leishmaniasis mucosa posterior a falla terapéutica con tratamiento convencional: Reporte de caso clínico. *Gaceta Médica Boliviana*, 40(1), 46–48.
- Rojas Cabrera, E., Verduguez-Orellana, A., Córdova Rojas, M., & Guzmán-Rivero, J. M. (2019). Antimoniato de meglumine perilesional en leishmaniasis cutánea con falla terapéutica sistémica: Serie de casos. *Gaceta Médica Boliviana*, 42(1), 74–78. Retrieved from: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-2966201900010013&ing=es&tlng=es <https://doi.org/10.47993/gmb.v42i1.62>
- Teles, C. B., Medeiros, J. F., Santos, A. P., de Freitas, L. A., Katsuragawa, T. H., Cantanhede, L. M., Ferreira, R., & Camargo, L. M. (2015). Molecular characterization of American cutaneous leishmaniasis in the tri-border area of Assis Brazil, Acre State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4), 343–347. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400012>
- Torrice-Rojas, M. C., & Zuleta-Durán, M. F. (2010). Manual de normas y procedimientos técnicos de laboratorio (para Leishmaniasis); Ministerio de Salud y Deportes Bolivia, 20(4), 2010-06-07, ISBN: 978-99954-50-13-7
- Tsukayama, P., Lucas, C., & Bacon, D. J. (2009). Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 39(3), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.004>
- Valdivia, H. Q., Reis-Cunha, J. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Baptista, R. P., Baldevidiano, G. C., Gerbasí, R. V., Dobson, D. E., Pratlong, F., Bastien, P., Lesscano, A. G., Beverley, S. M., & Barboiomes, D. C. (2015). Comparative genomic analysis of *Leishmania* (*Vannia*) *peruviana* and *Leishmania* (*Vannia*) *braziliensis*. *Bmc Genomics* (Electronic Resource), 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1928-z>
- Van den Broeck, F., Savill, N. J., Imamura, H., Sanders, M., Maes, I., Cooper, S., Mateus, D., Jara, M., Adau, V., Arevalo, J., Ulanos-Cuentas, A., García, L., Cupolillo, E., Miles, M., Berriman, M., Schnauffer, A., Cotton, J. A., & Dujardin, J. C. (2020). Ecological divergence and hybridization of Neotropical *Leishmania* parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(40), 25159–25168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920136117>
- Van der Auwera, G., Bart, A., Chicharro, C., Cortes, S., Davidsson, L., Di Muccio, T., Dujardin, J., Felger, I., Paglia, M. G., Grimm, F., Harms, G., Jaffe, C., Manser, M., Ravel, C., Robert-Gangneux, F., Roelfsema, J., Töz, S., Verweij, J. J., & Chiodini, P. L. (2016). Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Eurosurveillance*, 21(49), 30418. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30418>
- Van der Auwera, G., & Dujardin, J. C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical Microbiology Review*, 28(2), 265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>
- Van der Auwera, G., Maes, I., De Doncker, S., Ravel, C., Cnops, L., Van Esbroeck, M., Van Gompel, A., Clerinx, J., & Dujardin, J. C. (2013). Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Eurosurveillance*, 18(30), 20543. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20543>
- Van der Auwera, G., Ravel, C., Verweij, J. J., Bart, A., Schönian, G., & Felger, I. (2014). Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania*

species discrimination by sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1098–1104. <https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13>

Van Griensven, J., Carrillo, E., López-Vélez, R., Lynen, L., & Moreno, J. (2014). Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), 286–299. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12556>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Torrico, M. C., Fernández-Arévalo, A., Ballart, C., Solano, M., Rojas, E., Ariza, E., Tebar, S., Lozano, D., Abras, A., Gascón, J., Picado, A., Muñoz, C., Torrico, F., & Gállego, M. (2022). Tegumentary leishmaniasis by *Leishmania braziliensis* complex in Cochabamba, Bolivia, including the presence of *L. braziliensis* outlier. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69, 2242–2255. <https://doi.org/10.1111/tbed.14228>

CAPÍTULO 2

“Usefulness of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in the Characterization of Leishmania Strains Causing Tegumentary Leishmaniosis in Bolivia versus hsp70 Gene Sequencing”

UTILIDAD DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DESORCIÓN/IONIZACIÓN LÁSER ASISTIDA POR LA MATRIZ CON DETECCIÓN DE MASAS POR TIEMPO DE VUELO EN LA CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *LEISHMANIA* CAUSANTES DE LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA FRENTE A LA SECUENCIACIÓN DEL GEN *HSP70*

Mary Cruz Torrico, Anna Fernández-Arévalo, Cristina Ballart, Marco Solano, Ernesto Rojas, Alba Abras, Fabiola Gonzales, Albert Arnau, Silvia Tebar, Teresa Llovet, Daniel Lozano, Eva Ariza-Vioque, Joaquim Gascón, Albert Picado, Faustino Torrico, Carmen Muñoz, Montserrat Gállego.

MICROBIOLOGY SPECTRUM 2023, vol. 11 (1) p. 1-9

Factor de impacto: 9.043

RESUMEN

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) es una técnica proteómica con eficacia comprobada en la identificación de microorganismos, como bacterias, hongos y parásitos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la utilidad de MALDI-TOF MS para la caracterización de las especies de *Leishmania* circulantes en Bolivia utilizando la secuenciación del gen *hsp70* como técnica de referencia. Se analizaron 55 cepas de *Leishmania* que fueron aisladas de pacientes con leishmaniosis tegumentaria. MALDI-TOF MS identificó dos especies del complejo *L. braziliensis* (*L. braziliensis*, n = 26; *L. braziliensis* outlier, n = 18), una especie del complejo *L. guyanensis* (*L. guyanensis*, n = 1), una especie del complejo *L. lainsoni* (*L. lainsoni*, n = 2), y dos especies del complejo *L. mexicana* (*L. amazonensis*, n = 5 y *L. garnhami*, n = 3). Todas las cepas fueron identificadas correctamente a nivel de género, subgénero y complejo, pero 10 de ellas (18%) fueron identificadas erróneamente como otras especies dentro del mismo complejo por la secuenciación del gen *hsp70*, correspondiendo 7 de ellas a posibles híbridos. Así, una *L.*

braziliensis correspondió a *L. peruviana*, dos *L. braziliensis* correspondieron a *L. braziliensis/L. peruviana* posibles híbridos, dos *L. amazonensis* correspondieron a *L. mexicana*, y tres *L. garnhami* y dos *L. amazonensis* correspondieron a *L. mexicana/L. amazonensis* posibles híbridos. En conclusión, MALDI-TOF MS podría utilizarse como una alternativa a las técnicas moleculares para la identificación de *Leishmania* spp., ya que es de bajo costo, simple de aplicar y capaz de producir resultados rápidamente. En Bolivia, su aplicación permitiría mejorar la gestión del seguimiento de los pacientes, la actualización de los datos epidemiológicos de las especies de *Leishmania* y contribuir al control de la leishmaniosis tegumentaria.

Palabras clave: *Leishmania*, caracterización, MALDI-TOF MS, secuenciación del gen *hsp70*, leishmaniasis tegumentaria, Bolivia.



Usefulness of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in the Characterization of *Leishmania* Strains Causing Tegumentary Leishmaniasis in Bolivia versus *hsp70* Gene Sequencing

Mary Cruz Torrico,^{a,b,c} Anna Fernández-Arévalo,^c Cristina Ballart,^{c,d} Marco Solano,^e Ernesto Rojas,^f Alba Abras,^g Fabiola Gonzales,^h Albert Arnaú,^h Silvia Tebar,^c Teresa Llovet,^h Daniel Lozano,^{a,b} Eva Ariza-Vioque,^h Joaquim Gascón,^d Albert Picado,^d Faustino Torrico,^{a,b} Carmen Muñoz,^{h,i} Montserrat Gállego^{c,d}

^aFacultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia

^bFundación CEADES y Medio Ambiente, Cochabamba, Bolivia

^cSecció de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^dInstituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), Barcelona, Spain

^eDepartament de Biologia, Universitat de Girona, Girona, Spain

^fServici de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Barcelona, Barcelona, Spain

^gDepartament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^hInstitut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

ⁱCIBERINFEC, ISCIII-CBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III

Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau, Barcelona, Spain

Anna Fernández-Arévalo and Cristina Ballart contributed equally to the work.
Carmen Muñoz and Montserrat Gállego should be considered joint senior authors.

ABSTRACT Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a proteomic technique with proven efficiency in the identification of microorganisms, such as bacteria, fungi, and parasites. The present study aimed to evaluate the usefulness of MALDI-TOF MS for the characterization of *Leishmania* species circulating in Bolivia using *hsp70* gene sequencing as a reference technique. 55 *Leishmania* strains that were isolated from patients with tegumentary leishmaniasis were analyzed. MALDI-TOF MS identified two species of the *L. braziliensis* complex (*L. braziliensis*, $n = 26$; *L. braziliensis* outlier, $n = 18$), one species of the *L. guyanensis* complex (*L. guyanensis*, $n = 1$), one species of the *L. lainsoni* complex (*L. lainsoni*, $n = 2$), and two species of the *L. mexicana* complex (*L. amazonensis*, $n = 5$; and *L. garnhami*, $n = 3$). All of the strains were correctly identified at the subgenus, genus, and complex level, but 10 of them (18%) were misidentified as other species within the same complex by the *hsp70* gene sequencing, with 7 of these corresponding to possible hybrids. Thus, one *L. braziliensis* corresponded to *L. peruviana*, two *L. braziliensis* corresponded to *L. braziliensis*/*L. peruviana* possible hybrids, two *L. amazonensis* corresponded to *L. mexicana*, and three *L. garnhami* and two *L. amazonensis* corresponded to *L. mexicana*/*L. amazonensis* possible hybrids. Accordingly, MALDI-TOF MS could be used as an alternative to molecular techniques for the identification of *Leishmania* spp., as it is low cost, simple to apply, and able to quickly produce results. In Bolivia, its application would allow for the improvement of the management of patient follow-ups, the updating of the epidemiological data of the *Leishmania* species, and a contribution to the control of tegumentary leishmaniasis.

IMPORTANCE The objective of the study was to evaluate the usefulness of MALDI-TOF MS for the characterization of *Leishmania* species circulating in Bolivia, in comparison with the sequencing of the *hsp70* gene. In our study, all of the isolates could be identified, and no misidentifications were observed at the complex level. Although

Editor Neil A. Mabbott, University of Edinburgh
Copyright © 2023 Torrico et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Mary Cruz Torrico, marytorricogum@u.edu, or Montserrat Gállego, mgallego@ub.edu.

The authors declare no conflict of interest.

Received 2 October 2022

Accepted 23 November 2022

Published 12 January 2023

the equipment implies a high initial investment in our context, MALDI-TOF MS can be used in different areas of microbiology and significantly reduces the cost of testing. Once the parasite culture is obtained, the technique quickly yields information by accessing a free database that is available online. This would allow for the improvement of the management of patients and follow-ups, the updating of the epidemiological data of the species, and a contribution to the control of tegumentary leishmaniasis in Bolivia. Likewise, it can be used to determine a specific treatment to be given, according to the causal species of *Leishmania*, when there are protocols in this regard in the area.

KEYWORDS *Leishmania*, characterization, MALDI-TOF MS, *hsp70* gene sequencing, tegumentary leishmaniasis, Bolivia

Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which includes at least 22 species that are pathogenic to humans and are grouped within the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. In the New World, 15 species of *Leishmania* with different patterns of tropism (visceral leishmaniasis [VL], cutaneous leishmaniasis [CL], and mucosal leishmaniasis [ML]) have been identified, and all of them cause tegumentary leishmaniasis (TL) (mucosal and cutaneous involvement) (1). In the last 20 years, the Pan American Health Organization (PAHO) has been notified of 1,067,759 cases of CL and ML in South America, and in 2020, the Plurinational State of Bolivia was the fourth country in the area in terms of the number of cases notified (2). In Bolivia, TL is present in seven of the nine departments into which the country is administratively divided (La Paz, Pando, Beni, Cochabamba, Santa Cruz, Tarija, and Chuquisaca) (3). The largest numbers of reported cases are concentrated in the first four of the mentioned departments (4). *Leishmania* species identification in Bolivia is performed only sporadically, but the available data indicate that *L. braziliensis* is the most prevalent, being characterized in 90% of lesions in TL patients, and this is followed by *L. braziliensis* outlier (39%) and *L. lainsoni* (7%) (5, 6). Other species present in the country are *L. guyanensis* and *L. amazonensis* (7, 8). Recently, *L. peruviana* has also been detected (6).

The characterization of *Leishmania* species is important in disease management, as it allows for the administration of the appropriate treatment, facilitates the prediction of disease evolution, and provides epidemiological data on leishmaniasis (9, 10). Several biochemical (isoenzyme electrophoresis and isoelectrofocusing) and molecular techniques such as random amplified polymorphic DNA (RAPD), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR-sequencing, multilocus sequence typing (MLST), multilocus microsatellite typing (MLMT), etc., have been applied for the identification of *Leishmania* species in different areas of the world (11–15). A widely used strategy is based on PCR amplification and the sequencing of the gene encoding a 70 kDa heat shock protein (*hsp70*) (13, 16, 17), which is highly conserved and occurs in multiple copies arranged in tandem (18).

Proteomic techniques, such as matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) are currently being applied to characterize microorganisms (19, 20).

A MALDI-TOF MS technique to identify *Leishmania* spp. was first developed in 2014 (21–23). Due to its simplicity, speed in obtaining results, and low cost, MALDI-TOF MS could represent a suitable method for *Leishmania* characterization in countries with limited access to molecular tools but where the technique is already available in microbiology laboratories for the routine identification of bacteria and yeasts. Thus, the present study aimed to evaluate the usefulness of MALDI-TOF MS in the characterization of the *Leishmania* species causing TL in Bolivia, using *hsp70* gene sequencing as a reference technique.

RESULTS

Characterization via *hsp70* gene sequencing. By sequencing the *hsp70* gene, we identified 55 stains as follows: 23 *L. braziliensis*, 18 *L. braziliensis* outlier, 1 *L. peruviana*, 1 *L. guyanensis*, 2 *L. lainsoni*, 2 *L. mexicana* and 1 *L. amazonensis*, as well as 2 possible hybrids of *L. braziliensis/L. peruviana*, and 5 of *L. mexicana/L. amazonensis*.

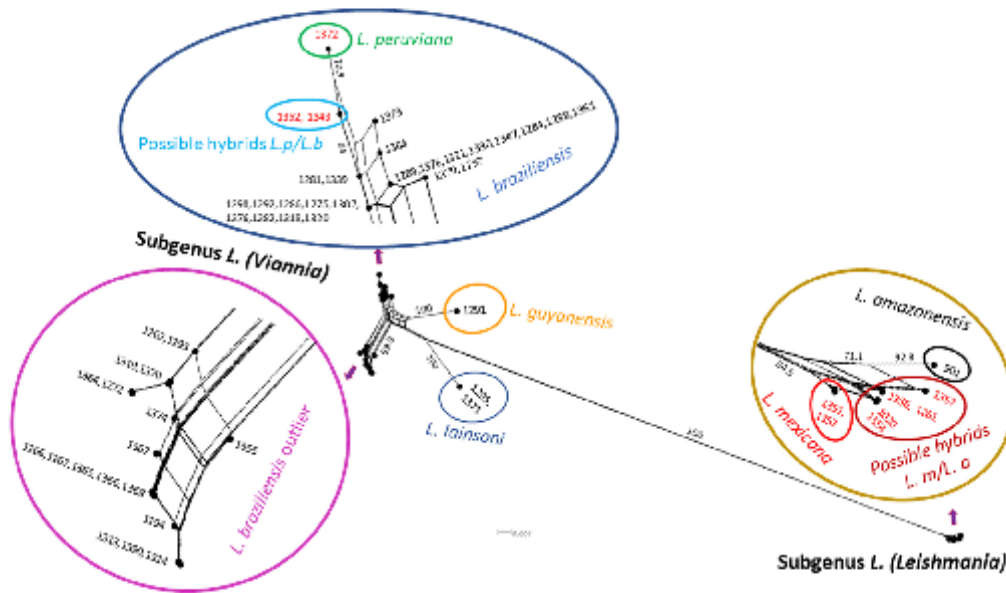


FIG 1 Genetic distance evaluation of *hsp70* by Neighbor-Net in *Leishmania* strains isolated from TL patients in Bolivia. The bootstrap values (1,000 replicates) are shown at the nodes (percentages), as are their relationships with the MALDI-TOF MS characterization results. The numbers in red correspond to the strains that were otherwise identified by MALDI-TOF MS, namely, *L. peruviana*, *L. mexicana* and hybrid strains of *L. peruviana/L. braziliensis* and *L. mexicana/L. amazonensis*.

The genetic distances of the 55 strains that were analyzed via *hsp70* gene sequencing were evaluated via Neighbor-Net (NN) (Fig. 1). The networks showed a clear bifurcation between the subgenera *L. (Viannia)* and *L. (Leishmania)* (Bootstrap 100) as well as the division of the subgenus *L. (Viannia)* into three complexes: *L. braziliensis*, *L. lainsoni*, and *L. guyanensis* (Bootstrap 100). Within the *L. braziliensis* complex, *L. braziliensis* outlier was clearly distanced from the rest, and within *L. braziliensis* "sensu stricto," a certain separation of *L. peruviana* was observed (Bootstrap 70.9). Within the subgenus *L. (Leishmania)*, *L. amazonensis* was positioned separately from the other strains (Bootstrap 92.8), and the five possible hybrid strains of *L. mexicana/L. amazonensis* were located between *L. mexicana* and *L. amazonensis* (Bootstrap 66.2), but more closely to the former.

MALDI-TOF MS. MALDI-TOF MS identified the 55 strains as follows: 26 *L. braziliensis*, 18 *L. braziliensis* outlier, 1 *L. guyanensis*, 2 *L. lainsoni*, 5 *L. amazonensis*, and 3 *L. ganhami*. All of the isolates were correctly identified at the subgenus, genus, and complex level, but the comparison with the *hsp70* results indicated that 10 (18%) were misidentified as other species within the same complex. In 42 cases, the identifications were performed with confidence index A (76.4%), and in 13 cases, the identifications were performed with confidence index B (23.6%) (Table 1).

The MALDI-TOF MS characterization technique correctly identified 81.8% of the strains when considering all of the analyzed strains, and it correctly identified 93.8% of the strains when excluding the potential hybrid strains. MALDI-TOF MS cannot identify potential *Leishmania* hybrids, whereas the analysis of the *hsp70* gene polymorphism can detect the genetic characteristics of both species.

DISCUSSION

Among the great variety of techniques used to identify *Leishmania* species, isoenzyme characterization has long been considered the gold standard (24, 25). Nevertheless, due to

TABLE 1 Evaluation of the MALDI-TOF MS technique versus *hsp70* gene sequencing for the characterization of the *Leishmania* strains causing TL in Bolivia

Subgenus	Complex	<i>hsp70</i> gene sequencing	MALDI-TOF MS	
		Species (n)	Species (n)	Index
<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> (23)	<i>L. braziliensis</i> (23)	A(16), B(7)
		<i>L. braziliensis</i> outlier (18)	<i>L. braziliensis</i> outlier (18)	A
		<i>L. peruviana</i> (1)	<i>L. braziliensis</i> (1)	A
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. braziliensis/L. peruviana</i> (2) ^a	<i>L. braziliensis</i> (2)	A
		<i>L. guyanensis</i> (1)	<i>L. guyanensis</i> (1)	B
<i>L. lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i> (2)	<i>L. lainsoni</i> (2)	A	
<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> (2)	<i>L. amazonensis</i> (2)	A
		<i>L. amazonensis</i> (1)	<i>L. amazonensis</i> (1)	B
		<i>L. mexicana/L. amazonensis</i> (5) ^b	<i>L. garhamsi</i> (3)	A(1), B(2)
			<i>L. amazonensis</i> (2)	B

^aPossible hybrids: *L. braziliensis/L. peruviana*.

^bPossible hybrids: *L. mexicana/L. amazonensis*.

the complexity of the isoenzyme technique, characterization is currently carried out mainly via molecular analysis, although this occurs without consensus on what constitutes the most suitable method or marker (25,26).

MALDI-TOF MS is a proteomic technique that has proved highly useful for the identification of microorganisms, including bacteria, fungi, and parasites (27–30). First introduced in 1987, its developers were awarded with a Nobel Prize in 2002 (31). This technique is accurate and inexpensive, provides comprehensive information, and is fast and easy to handle (32, 33).

MALDI-TOF MS is now integrated into the daily routine work of many laboratories, greatly simplifying pathogen identification and improving patient care (34). Several well-established open access and commercial platforms based on MALDI-TOF MS are available for the identification of bacteria and yeasts. Most of the proprietary spectral databases can be customized by adding spectra to improve the discriminatory power of MALDI-TOF MS, including in strain typing (31).

The MALDI-TOF MS technique was first applied for *Leishmania* identification in 2014, with the creation of a library that can be accessed through a free, web-based application (21, 23). A commercial spectral library for *Leishmania* identification is still unavailable, and the methodology is mainly used in reference laboratories that either have their own databases or access the online library at <https://msi.happy-dev.fr/> and apply their own interpretive criteria. Previous reports indicate that the identification of *Leishmania* strains via MALDI-TOF MS generates more discrepancies for New World species than for Old World species, with the exception of the *L. donovani* complex (13, 21, 22, 35).

The suitability of MALDI-TOF MS for the identification of *Leishmania* has been scarcely investigated to date. To our knowledge, two studies assessed its performance in routine practice, but they analyzed a small number of strains: a study carried out in France with 20 strains isolated from travelers with CL (n = 19) and VL (n = 1) (35) and another in Turkey, including 2 strains isolated from 2 patients with CL (22). Another comparative study of analytical methods, including MALDI-TOF MS, analyzed 53 strains isolated from autochthonous and imported cases of TL in Spain (36).

In our context, 55 *Leishmania* strains that were isolated from patients in Bolivia were analyzed via both MALDI-TOF MS and *hsp70* sequencing (the latter as a reference) to assess the usefulness of mass spectrometry in this context. The strains were isolated from TL patients in a Cochabamba laboratory that routinely performs culture-based diagnosis (37). Once the strains are obtained, the application of the MALDI-TOF technique is straightforward (35). In our study, all of the *Leishmania* strains were correctly identified at the subgenus and complex levels by MALDI-TOF MS. At the species level, 45 strains (81.8%) were correctly identified. Previous studies reported inconclusive results or misidentifications at the complex level for certain strains. Cassagne et al. (21)

obtained uninterpretable results for two strains of *L. major*. Mouri et al. (35) could not differentiate between species of the *L. braziliensis* and *L. guyanensis* complexes, and similarly, there was one strain in Lachaud et al. (23) that was misidentified between these complexes. Recently, the MSI online application (used here and in Lachaud et al. (23)) has been improved by the incorporation of new reference strains and modifications to the algorithm. However, there are still identification problems with the *L. peruviana* and *L. mexicana* strains. Regarding the hybrid strains found in our study, all were identified as a single species. No studies were found concerning the analysis of hybrid strains via MALDI-TOF MS. When excluding the possible hybrids, we observed an increase of the correctly identified strains (93.8%). Comparable results have been obtained in previous studies, with their agreement percentages ranging from 86% to 95.65% (13, 21, 23).

Similar misidentifications of *Leishmania* species have also been reported. In a study in which 268 strains were analyzed via MALDI-TOF MS using MLEE, RFLP, and *hsp70* and *rpIIIS* gene sequencing as reference techniques (23), 31 of the strains (11.6%) were erroneously characterized. Discrepancies mainly arose in the identification of species within the *L. braziliensis* and *L. guyanensis* complexes from the New World and within the *L. donovani* complex from the Old World. In our study, the misidentification of *Leishmania* species by MALDI-TOF MS was 6/42 (14.3%) with confidence index A and 4/13 (30.8%) with confidence index B, which indicates that misidentification at the species level was independent of the confidence index and was more likely related to possible hybrid strains.

Among the strains identified with confidence index A, one *L. peruviana* isolate was characterized as *L. braziliensis*. The taxonomic position of *L. peruviana* in the *L. braziliensis* complex has been the subject of discussion (6, 24) and although both species are commonly misidentified, there is a stronger tendency for the ambiguous strains to be characterized as *L. peruviana* (13, 23). Additionally, two strains of *L. mexicana* were erroneously identified as *L. amazonensis*, another member of the *L. mexicana* complex. Misidentification at the species level in this complex is also frequent, and *L. mexicana* has been identified as *L. pifanoi* (and vice-versa) (23).

Of the 13 strains identified by confidence index B, a correct identification was found for *L. braziliensis* ($n = 7$), *L. guyanensis* ($n = 1$), and *L. amazonensis* ($n = 1$). In contrast, other studies have failed to correctly distinguish *L. guyanensis* from other species of the complex (23, 36). Misidentifications with confidence index B may be due to sample quality, parasite concentration, and the type of culture media used (35). However, the main issue is not inaccurate profiling, as reliable results have been obtained with MALDI-TOF MS for a wide spectrum of bacterial microorganisms (38). Instead, the main limitation of this system is its dependence on the quality and precision of the database, in which all organisms need to be represented equally, and the spectra, which should not be obtained solely from clinical strains (39). For example, the inaccurate identification of filamentous fungi by MALDI-TOF MS seems to be more related to the heterogeneity of protein profiles and their lack of representation in current databases (38). Similarly, for *Leishmania* species identification, the spectral library should be expanded to include strains from different regions that are endemic for leishmaniasis and, in particular, reference spectra from New World strains. Improving the software with additional data (27) would allow the identification of less frequent species, as recommended for mycobacteria (32). Nevertheless, in the case of *L. lainsoni*, for which only two strains have been described, a correct identification was obtained, as in other studies (23).

MALDI-TOF MS represents a useful tool for the rapid and accurate characterization of the *L. braziliensis* outlier, which seems less likely to cause complications than does *L. braziliensis* "sensu stricto". According to our results, none of these strains were isolated from ML, nor were they associated with therapeutic failures in treated patients (6).

Other probable explanations for the misidentifications and low confidence indices are related to genetics. When the results of MALDI-TOF MS are superimposed on the NN network, the strains of the subgenus *Leishmania* ($n = 8$) are clearly separated from those of the

subgenus *Viannia* (Bootstrap 100). Also, *L. lainsoni* and *L. guyanensis* (Bootstrap 100) of the subgenus *Viannia*, as well as *L. braziliensis* outlier (Bootstrap 99.9), all form widely distanced clusters, and they were correctly identified by MALDI-TOF MS. On the other hand, less obvious genetic distances were observed between the *L. braziliensis* "sensu stricto" strains, the two possible *L. peruviana*/*L. braziliensis* hybrids, and even *L. peruviana* (Bootstrap 70.9), all of which were classified as *L. braziliensis* by MALDI-TOF MS.

Within the *L. mexicana* complex, excluding the hybrids, all of the strains (two *L. mexicana* and one *L. amazonensis*) were characterized by MALDI-TOF MS as *L. amazonensis*. These divergent results may be due to the high genetic and geographic variability between members of the complex, although this has not been comprehensively explored to date (24). Moreover, few strains belonging to the complex have been included in previous assessments of MALDI-TOF MS performance (21, 23, 35). Even so, in the NN network, the *L. amazonensis* strain identified by MALDI-TOF MS with index B appears to be separated from the other strains of the *L. mexicana* complex, displaying a bootstrap value of 92.8, which supports a correct identification at the species level.

The seven strains identified as possible hybrids in this study deserve particular attention. The two strains of *L. braziliensis*/*L. peruviana* and five strains of *L. mexicana*/*L. amazonensis* were identified by MALDI-TOF MS as species within the *L. braziliensis* and *L. mexicana* complexes, respectively. This limitation, namely, the lack of discrimination by MALDI-TOF MS, is possibly due to the variability of the *hsp70* gene sequence in the *L. braziliensis*/*L. peruviana* hybrid strains, which have been previously analyzed (6, 40, 41). We observed that the possible hybrid strains of the *L. mexicana* complex present 3 to 4 polymorphic sites in the *hsp70* gene (data not shown). Although this New World complex has been studied previously (24), no data about hybrids have been reported. Some Bolivian variants of the *L. mexicana* complex have been described based on *Cyt-b* gene and ITS-1 sequencing (8), and there is evidence of genetic exchange for *L. amazonensis*, both in the culture of axenic promastigotes and in infected macrophages, but not in humans (42). *Leishmania* hybrids have also been found between Old World species, such as *L. aethiopica*/*L. donovani* (43), *L. infantum*/*L. donovani* in vectors (44), and *L. infantum*/*L. major* in *in vitro* assays and *in vivo* infections (45). MALDI-TOF MS could also be limited for their identification.

MALDI-TOF has the disadvantage of requiring axenic cultures of parasites for species identification because, in most cases, the low number of microorganisms present in clinical samples does not allow for the obtaining of accurate spectra (39). It is expected that recent innovations, such as the incorporation of imaging mass spectrometry, will allow for the direct analysis of tissue sections in the near future (46). For now, according to our results, MALDI-TOF MS constitutes an alternative technique in clinical microbiology laboratories for the identification of TL-causing *Leishmania* species when parasites are cultured for parasitological diagnosis, as in ours. Once the parasite culture is obtained (7 to 21 days, in our case), the technique rapidly yields information, allowing patients to receive prompt and precise treatments. The PAHO guide recommendations for the treatment of CL indicate that if the most prevalent species in the region is known, treatment should be initiated according to the clinical condition and the availability of the medication, as well as in consideration of the risk-benefit balance (10). Also, it is strongly recommended to treat adult patients with pentavalent antimonials in cases of *L. braziliensis* or mucosal or mucocutaneous leishmaniasis, and it is recommended to treat adult patients with miltefosine in cases in which *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis*, and *L. braziliensis* are implicated. In Bolivia, treatment is administered regardless of the parasite species, and only the patient follow-up after treatment is complex-dependent. The first-line treatment is done with antimonials, except for special cases of mucosal leishmaniasis, in which amphotericin B is administered (3). In this study, the predominant species was *L. braziliensis*, and other species of the *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. mexicana* complexes were identified. Thus, identification at the complex level remains adequate, as mentioned (23).

As mentioned, a limitation of the technique is the nondetection of possible hybrids that exist in certain areas, including in Bolivia, leading to the misidentification of

species within the same complex. Nevertheless, MALDI-TOF MS offers considerable advantages over characterization techniques that are based on molecular biology. Although the equipment involves a large initial investment, it can be used in different areas of microbiology and significantly reduces the time required to obtain results and the costs of tests. Therefore, MALDI-TOF MS would constitute a suitable tool for the characterization of *Leishmania* species in countries of endemicity, once access to the free online database becomes available. In Bolivia, its application would allow for the improvement of the management of the follow-up of patients, the updating of the epidemiological data of the *Leishmania* species, and a contribution to the control of tegumentary leishmaniasis. In Latin American countries, it could help patients receive a specific treatment when this is included in the existing guides, as recommended by the Pan American Health Organization.

MATERIALS AND METHODS

Leishmania isolates. A total of 55 *Leishmania* strains that were isolated from Bolivian patients in the region of Cochabamba (Bolivia) between 2004 and 2015 were used in this study. The isolates were cryopreserved at -80°C in the Laboratory of Parasitology at the Universidad Mayor de San Simón (UMSS) in Bolivia, and they were then sent to the Parasitology Laboratory at the University of Barcelona (UB) in Spain, where the strains were cryopreserved in the UB Trypanosomatid Cryobank until analysis.

Promastigotes were recovered by thawing the tubes containing the isolates in a water bath at 37°C and culturing in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, UK) supplemented with 20% fetal bovine serum (Life Science Production, Brazil) and 1% sterile human urine until the exponential phase of growth was reached (3×10^6 promastigotes/ml) (23).

hsp70 gene sequencing. Characterization via *hsp70* gene sequencing was performed as a reference technique in the Parasitology Laboratory of the UB (Barcelona, Spain). Using the commercial QIAmp DNA Minikit (Qiagen, Germany), DNA was extracted from 200 μL of culture in PBS, which was treated with 20 μL of proteinase K, following the manufacturer's instructions.

The amplification of the 1,245 bp *hsp70* gene was performed by means of two PCRs, PCR-N (552 bp) and PCR-T (723 bp), which together covered the entire fragment, according to the protocol described in Torto et al. (6). The PCR products were purified using EXOSAP-IT (Affymetrix USB, USA), and they were sequenced using the Sanger method at the Scientific and Technological Center of the UB (Barcelona, Spain). The identification of the *Leishmania* species is based on the comparison of the sequences under study with the reference sequences of the different species available in GenBank.

Neighbor-Net (NN) were generated from *hsp70* data sets using the SplitsTree software package, version 4.14.8 (47), using the uncorrected p method and an equal angles representation. The results of the *Leishmania* species characterization via MALDI-TOF MS were also included in the network to evaluate its usefulness for the identification of the *Leishmania* species that cause TL in Bolivia, compared to the reference method.

MALDI-TOF MS. The MALDI-TOF MS analysis was carried out in the Microbiology Laboratory of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP, Barcelona, Spain). A volume of 5 mL of exponential-phase promastigote culture was consecutively washed three times with 0.9% saline solution via centrifugation for 10 min at $1,690 \times g$. The last sediment obtained was resuspended in 20 μL of 0.9% saline solution. Immediately, 1 μL of each strain suspension (6 replicates per strain) was placed in the wells of the MALDI-TOF MS steel plate and homogeneously distributed using a toothpick. Once dried, each well was covered with 1 μL of matrix, α -cyano-4-hydroxydynamamic acid (Matrix HCCA Bruker, Bremen, Germany) and was allowed to dry again. 1 μL of Bacterial Test Standard (BTS) (Bruker, Bremen, Germany) was placed in the last well of the plate to validate the test in each run. Once the entire plate was dried, it was placed on the equipment support for reading. The mass spectra were acquired using an Autoflex II TOF-TOF Instrument (Bruker Daltonics) with the Flex Control program, version 3.4 (Bruker Daltonics), using the default parameters (36).

The spectra that were obtained were uploaded to the Mass Spectra Identifying (MSI) application, an online spectrum library that is available at <https://msi.happy-dev.fr/>, for identification. The protein profile spectra of our isolates were compared to those in the MSI online database, which compiles reference spectra for many *Leishmania* species. The application compares the values of the peaks obtained from the problem spectra with those of strains in the database, using its own algorithms, and it returns the identification and three similarity values with respect to: (i) the most similar spectrum in the library (first score), (ii) the most similar spectrum belonging to another species that is included in the same taxonomic complex as the first spectrum (second score), and (iii) the most similar spectrum for another species that is not included in that complex (3rd score). The similarity values range from 0 to 100, with the latter value indicating a perfect match. The application also provides an index that assesses the confidence of the identification: A, up to species level (first score of >22 , second score of >20 , and first-second of >8) or (first score of >20 but ≤ 22 and first-second of >2); B, up to genus level (first score of >22 , second score of >20 , and first-second of <8) or (first score of >20 but ≤ 22 and first-second score of <2), and C, irrelevant (no score >20). The characterization result was interpreted using the "best score" criterion, meaning that the identified species corresponds to that of the replica with the highest similarity value.

Ethical aspects. This research was carried out with isolates from patients with suspected TL who attended the LABIMED (Cochabamba, Bolivia) as part of a collaborative research project between ISGlobal (Barcelona, Spain) and the CEADES Foundation (Cochabamba, Bolivia), together with other Bolivian isolates that were stored in the cryobank of Trypanosomatids UB. The techniques used for the diagnosis of TL are part of the routine medical care in the health center in Cochabamba. The study protocol was approved in Spain by the Ethics Committees of the Hospital Clínic de Barcelona (HCB/2014/0582) and in Bolivia by both the CEADES Salud y Medio Ambiente and the Facultad de Medicina UMSS. All of the patients with suspected leishmaniasis provided written informed consent (parents or guardians, in cases in which the patient was under 18 years of age) before participating in the study. All of the suspected cases of TL were diagnosed free of charge, and confirmed cases were referred for treatment.

Data availability. The sequences were submitted to the GenBank databases under the accession numbers MWS07486–MWS07526 and OPS61794–OPS61807 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ACKNOWLEDGMENTS

The work carried out in Bolivia was supported by AECID (14-CO1-558). The participating UB and ISGlobal investigators are part of the GREPIMER group (Grup de Recerca en Patologia Importada i Malalties Emergents i Re-emergents), which received support from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR, 2017 SGR 924). ISGlobal research was supported by the Tropical Disease Cooperative Research Network (RICET) (RD12/0018/0010) and by the Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) (CB 2021), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and Unión Europea – NextGenerationEU. We acknowledge support from the Spanish Ministry of Science and Innovation and State Research Agency through the “Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019–2023” Program (CEX2018-000806-S), and support from the Generalitat de Catalunya through the CERCA Program. To the UB and the Journal for partially support the publication costs.

We thank all of the staff of LABIMED and IIBSMED for their support in the study.

REFERENCES

- Organización Panamericana de la Salud. 2019. Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. OPS, Washington, D.C. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf.
- Organización Panamericana de la Salud. 2021. Leishmaniasis. Informe epidemiológico de las Américas. N° 10. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55244>.
- Ministerio de Salud de Bolivia. 2015. Norma nacional y manual de procedimientos técnicos de leishmaniasis. Documentos Técnicos Normativos N° 364. La Paz. https://www.mhs.gob.bo/images/Documentacion/dgss/epidemiologia/leishmaniasis/365-Norma_Nacional_y_Manual_de_Procedimientos_Tecnicos_de_Leishmaniasis2015.pdf.
- Ministerio de Salud de Bolivia. 2017. Programa Nacional de Vigilancia y control de Leishmaniasis, p 51–54. In Anuario Epidemiológico 2016. Ministerio de Salud. <https://www.minsalud.gob.bo/component/download/task=download.send&id=99&catid=9&m=0&Itemid=646>.
- García AL, Parado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. 2007. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:368–371. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.06.009>.
- Torrico MC, Fernández-Antelo A, Ballart C, Sobino M, Rojas E, Ariza E, Tebar S, Lozano D, Abras A, Gascón J, Picado A, Muñoz C, Torrico F, Gállego M. 2021. Tegumentary leishmaniasis by *Leishmania braziliensis* complex in Cochabamba, Bolivia including the presence of *L. braziliensis* outlier: tegumentary leishmaniasis in Cochabamba, Bolivia. *Transbound Emerg Dis*: 1–14.
- Bastrenta B, Bultrago R, Vargas F, Le Pont F, Torrez M, Flores M, Mita N, Brenière SF. 2002. First evidence of transmission of *Leishmania (Viannia) binsoni* in a Sub Andean region of Bolivia. *Acta Trop* 83:249–253. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00129-8).
- Bilbao-Ramos P, Dea-Ayuela M, Cardenas-Alegria O, Salamanca E, Santalla-Vargas J, Benito C, Flores N, Bolás-Fernández F. 2017. Leishmaniasis in the major endemic region of Plurinational State of Bolivia: species identification, phylogeography and drug susceptibility implications. *Acta Trop* 176:150–161. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.006>.
- Montalvo A, Fraga J, Montano I, Monzote L, Van der Auwera G, Marín M, Mukus C. 2016. Identificación molecular con base en el gen hsp70 de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia. *Biomedica* 36:37–44. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688>.
- Organización Panamericana de la Salud. 2022. Directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. OPS. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56121/9789275325032_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Alkhoundi M, Downing T, Votýjka J, Kuhlís K, Lukeš J, Cnnet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, Giadoni L, Sereno D. 2017. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med* 57:1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>.
- Arana M, Evans DA, Zollesi A, Cuentas AL, Arevalo J. 1990. Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84:526–529. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90025-A](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90025-A).
- Fernández-Antelo A, El Baidouf F, Ravel C, Ballart C, Abras A, Lachaud L, Tebar S, Lami P, Pratlong F, Gállego M, Muñoz C. 2020. The *Leishmania donovani* species complex: a new insight into taxonomy. *Int J Parasitol* 50:1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.013>.
- Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, Van Gompel A, Clerinx J, Dujardin J. 2013. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill* 18:20543. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.JS2013.18.30.20543>.
- Van der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schönian G, Felger I. 2014. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. *J Clin Microbiol* 52:1098–1104. <https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13>.
- Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol* 10:238–245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>.
- Fraga J, Montalvo AM, Maes I, Dujardin J, Van der Auwera G. 2013. HindIII and SbfI digests of heat-shock protein 70 PCR for *Leishmania* typing. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77:245–247. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.023>.
- Folgosa C, Cafavate C, Chicharro C, Requena JM. 2007. Genomic organization and expression of the hsp70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology* 134:369–377. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001570>.

19. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 6:291.
20. Singhal N, Kumar M, Virdi JS. 2016. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. *Parasitology* 143:1491–1500. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001189>.
21. Cassagne C, Pratlong F, Jeddí F, Benihléf R, Aoun K, Normand AC, Faraut F, Bastien P, Piaroux R. 2014. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 20:551–557. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12887>.
22. Cuiha G, Akyar I, Yıldız Zeyrek F, Kurt Ö, Gündüz C, Özsenoy Töz S, Östan I, Cavus I, Gülkan B, Kocagöz T, Özbek Y, Özbilgin A. 2014. Leishmaniasis in Turkey: determination of *Leishmania* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Iran J Parasitol* 9:239–248.
23. Lachaud I, Fernández-Arvaló A, Normand AC, Lami P, Nabet C, Donnadieu JL, Piaroux M, Djénad F, Cassagne C, Ravol C, Tebar S, Llovet T, Blanchet D, Demar M, Hamat Z, Aoun K, Bastien P, Muñoz C, Gállego M, Piaroux R. 2017. Identification of *Leishmania* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-tof) mass spectrometry using a free web-based application and a dedicated mass-spectral library. *J Clin Microbiol* 55:2924–2933. <https://doi.org/10.1128/JCM.00845-17>.
24. Van der Auwera G, Dujardin J. 2015. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 28:265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>.
25. Organización Mundial de la Salud. 2010. Control de las leishmaniasis. Serie de Informes Técnicos N. 949. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf;sequence=1.
26. Schönan G, Kühls K, Mauricio L. 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138:405–425. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001538>.
27. Caballero JD, Martín O. 2018. Application of MALDI-TOF in parasitology, p 235–253. In Cobo F (ed), *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.000016-2>.
28. Franco-Álvarez de Luna F. 2018. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in fungal diagnosis, p 197–211. In Cobo F (ed), *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.000014-9>.
29. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. 2017. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infect* 22:35–45. <https://doi.org/10.22334/in.v010.703>.
30. Zárate M, Romano Y, Nieves J, Smayevsky J. 2014. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Rev Argent Microbiol* 46:98–102. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70055-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70055-0).
31. Clark A, Kaleta E, Aroca A, Wolk D. 2013. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 26:547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>.
32. Canal AM, Gómez MJ, Salvado CM. 2014. Cost-effectiveness study of the application of MALDI-TOF MS technique in the identification of atypical mycobacteria. *Gest y Eval Cost Sanit* 15:417–481.
33. García P, Allende F, Legarriga P, Huilcaman M, Solari S. 2012. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Rev Chilena Infectol* 29:263–272. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000300003>.
34. Seng P, Drancourt M, Gourlet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. 2009. Ongoing evolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49:543–551. <https://doi.org/10.1086/600886>.
35. Mout R, Moritz G, Van der Auwera G, Ravol C, Passet F, Charrel N, Joly I, Thaller M, Jungbuberry S, Caumes E, Mazler D, Marinach-Patrice C, Buffet P. 2014. Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2841. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002841>.
36. Fernández-Arvaló A, Ballart C, Muñoz-Basagottí J, Basarte L, Lobato G, Amaro A, Abas A, Tebar S, Llovet T, Lami P, Pratlong F, Alsina M, Roe E, Puig I, Muñoz C, Gállego M. 2022. Autochthonous and imported tegumentary leishmaniasis in Catalonia (Spain): aetiological evolution in the last four decades and usefulness of different typing approaches based on biochemical, molecular and proteomic markers. *Transbound Emerg Dis* 69:1404–1418. <https://doi.org/10.1111/tbed.14107>.
37. Ballart C, Torrico MC, Vidal G, Torrico F, Lozano D, Gállego M, Pinto L, Rojas E, Aguilera R, Dobaño C, Ares-Gomez SS, Picado A. 2021. Clinical and immunological characteristics of tegumentary leishmaniasis cases in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis* 15:e0009223. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009223>.
38. Ballesté RN. 2018. Proteomics: technology and applications, p 1–17. In Cobo F (ed), *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00001-0>.
39. Ulléna-Martos C. 2018. Indications, interpretation of results, advantages, disadvantages and limitations of MALDI-TOF, p 75–86. In Cobo F (ed), *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.000005-8>.
40. Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, Le Ray D, Arevalo J, Tibayrenc M. 1995. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huancayo, Peru. *Acta Trop* 59:293–307. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(95\)00094-u](https://doi.org/10.1016/0001-706x(95)00094-u).
41. Nolder D, Roncal N, Davies C, Llanos-Cuentas A, Miles M. 2007. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (Winnia) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 76:573–578. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.573>.
42. Talitshenko R, Descoteaux A. 2020. Study on the occurrence of genetic exchange among parasites of the *Leishmania mexicana* complex. *Front Cell Infect Microbiol* 10:607253. [https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.607253](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.607253/full).
43. Odhwoor S, De Doncker S, Maes I, Dujardin J-C, Van der Auwera G. 2011. Natural *Leishmania donovani*/*Leishmania aethiops* hybrids identified from Ethiopia. *Infect Genet Evol* 11:2113–2118. <https://doi.org/10.1016/j.meagid.2011.04.026>.
44. Sebllova V, Myskova J, Hlavacova J, Votypka J, Antonilo M, Volp P. 2015. Natural hybrid of *Leishmania infantum*/*L. donovani*: development in *Phlebotomus tobbi*, *P. perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis* and comparison with non-hybrid strains differing in tissue tropism. *Parasit Vectors* 8:605. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1217-3>.
45. Cortes S, Albuquerque-Wendt A, Maia C, Carvalho M, Lima IA, De Freitas LAR, Dos-Santos WLC, Campino L. 2019. Euclidathin in vitro and in vivo phenotypic behaviour of *L. infantum*/*L. major* natural hybrids. *Parasitology* 146:580–587. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001993>.
46. Perutka Z, Sebelka M. 2018. Basis of mass spectrometry: technical variants, p 19–45. In Cobo F (ed), *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00002-2>.
47. Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23:254–267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>.

CAPÍTULO 3

“The need for culture in tegumentary leishmaniasis diagnosis in Bolivia: a comparative evaluation of four parasitological techniques using two sampling methods.”

“LA NECESIDAD DEL CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA
LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA EN BOLIVIA: UNA EVALUACIÓN
COMPARATIVA DE CUATRO TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS
UTILIZANDO DOS MÉTODOS DE MUESTREO”

Mary Cruz Torrico, Cristina Ballart, Anna Fernández-Arévalo, Marco Solano, Ernesto Rojas,
Alba Abras, Fabiola Gonzales, Yercin Mamani, Albert Arnau, Daniel Lozano, Joaquim Gascón,
Faustino Torrico, Albert Picado, Carmen Muñoz, Montserrat Gállego.

SUBMITTED TO ACTA TROPICA JOURNAL

RESUMEN

En Bolivia, la leishmaniasis tegumentaria se diagnostica de forma rutinaria mediante Examen Parasitológico Directo mediante tinción de Giemsa y observación microscópica; el cultivo axénico es realizado únicamente por laboratorios especializados con infraestructura adecuada y personal capacitado, mientras que las pruebas moleculares se limitan a investigaciones o estudios epidemiológicos debido a su alto costo y la ausencia de un método estándar de oro. El objetivo del presente estudio fue optimizar el diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria en Bolivia mediante la evaluación de la utilidad de diferentes técnicas parasitológicas y métodos de muestreo.

Participaron en el estudio un total de 117 pacientes con sospecha de leishmaniasis tegumentaria. Se utilizaron dos métodos simultáneamente para obtener muestras de cada paciente, aspirado y raspado el borde de la lesión, dando como resultado un total de 242 muestras (cuatro pacientes proporcionaron más de dos). Las muestras fueron procesadas en paralelo mediante cuatro técnicas de diagnóstico parasitológico diferentes: examen parasitológico directo, cultivo en medio TSTB y minicultivo y microcultivo en medio de Schneider. La leishmaniasis tegumentaria fue confirmada en 96 pacientes (82%) mediante al menos una técnica parasitológica y un método de muestreo,

que se consideró el estándar de oro de referencia. Las cuatro técnicas parasitológicas tuvieron una especificidad del 100% y su sensibilidad analítica fue mayor con muestras de raspado (45%, 98%, 94% y 75%, respectivamente) que con espirados (32%, 90%, 89% y 72%, respectivamente). El cultivo en medio TSTB y el minicultivo en medio de Schneider utilizando muestras de raspado se correlacionaron bien con el estándar de oro ($k\text{-Cohen}=0,88$) y mostraron una buena confiabilidad ($\alpha\text{-Cronbach} \geq 0,91$). El microcultivo en medio de Schneider con ambos métodos de muestreo proporcionó resultados positivos antes que los otros métodos de cultivo (día medio 4,5, rango de días 2 a 17). El 98% de los cultivos positivos en medio TSTB con ambos tipos de muestras se detectaron el día 14. El muestreo por raspado y el minicultivo en medio de Schneider se asociaron con una mayor contaminación del cultivo, siendo las bacterias los organismos contaminantes predominantes en todas las técnicas de cultivo evaluadas (6% a 17%).

En conclusión, las muestras por raspado resultaron más adecuadas para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria ya que aumentaron la sensibilidad analítica, son menos traumáticas para el paciente y más seguras para el personal de laboratorio que las muestras por aspirado. El cultivo, principalmente en medio TSBT, debe utilizarse para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria debido a su alta sensibilidad en comparación con los otros métodos parasitológicos estudiados y su bajo costo en comparación con los otros medios de cultivo.

Palabras clave: leishmaniasis tegumentaria, diagnóstico parasitológico, técnicas de cultivo, muestra de aspirado, muestra de raspado, Bolivia.

Acta Tropica

The need for culture in tegumentary leishmaniasis diagnosis in Bolivia: a comparative evaluation of four parasitological techniques using two sampling methods.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Protozoans(excl. Plasmodium spp), pathogenesis; diagnosis, eco-epidemiology, genetics, vectors, immu
Keywords:	tegumentary leishmaniasis; parasitological diagnosis; culture techniques; aspirate sample; scraping sample; Bolivia
Corresponding Author:	Mary Cruz Torrico, Magister Universidad Mayor de San Simón Cochabamba, Cercado BOLIVIA, PLURINATIONAL STATE OF
First Author:	Mary Cruz Torrico, Magister
Order of Authors:	Mary Cruz Torrico, Magister Cristina Ballart, Doctor Anna Fernández-Arévalo, Doctor Marco Solano, Magister Ernesto Rojas, Magister Alba Abras, Doctor Fabiola Gonzales, Licenciatura Yercin Mamani, Doctor Albert Arnau Daniel Lozano, Magister Joaquim Gascón, Doctor Albert Picado, Doctor Faustino Torrico, Doctor Carmen Muñoz Montserrat Gállego, Doctor
Abstract:	<p>In Bolivia, tegumentary leishmaniasis is routinely diagnosed by a Direct Parasitological Exam using Giemsa staining and microscopic observation; axenic culture is performed only by specialized laboratories with suitable infrastructure and trained personnel, whereas molecular tests are limited to research or epidemiological studies due to their high cost and the absence of a gold standard method. The aim of the present study was to optimize the parasitological diagnosis of tegumentary leishmaniasis in Bolivia by evaluating the usefulness of different parasitological techniques and sampling methods.</p> <p>A total of 117 patients with suspected tegumentary leishmaniasis participated in the study. Two methods were used simultaneously to obtain samples from each patient, aspirate and scraping the edge of the main lesion, resulting in a total of 242 samples (four patients provided more than two). The samples were processed in parallel by four different parasitological diagnostic techniques: a direct parasitological exam, culture in TSTB medium, and miniculture and microculture in Schneider's medium. Tegumentary leishmaniasis was confirmed in 96 patients (82%) by at least one parasitological technique and one sampling method, which was considered the reference gold standard. All four parasitological techniques had a specificity of 100% and their analytical sensitivity was greater with scraping samples (45%, 98%, 94%, and 75%, respectively) than spirates (32%, 90%, 89%, and 72%, respectively). Culture in TSTB</p>

medium and miniculture in Schneider's medium using scraping samples correlated well with the gold standard (κ -Cohen=0.88) and showed good reliability (α -Cronbach ≥ 0.91). Microculture in Schneider's medium with both sampling methods provided positive results earlier than the other culture methods (mean day 4.5, range of days 2 to 17). 98% of positive cultures in TSTB medium with both sample types were detected by day 14. Scraping sampling and miniculture in Schneider's medium were associated with higher culture contamination, bacteria being the predominant contaminating organisms in all culture techniques evaluated (6% to 17%).

In conclusion, scraping samples proved more suitable for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis as they increased analytical sensitivity, are less traumatic for the patient and are safer for laboratory personnel than aspirates. Culture, principally in TSBT medium, should be used for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis due to its high sensitivity compared to the other parasitological methods studied and its low cost in comparison with the other culture media.

1 The need for culture in tegumentary leishmaniasis diagnosis in Bolivia: a comparative evaluation
2 of four parasitological techniques using two sampling methods.

3
4 Mary Cruz Torrico^{a,b,c}, Cristina Ballart^{b,d*}, Anna Fernández-Arévalo^{b*}, Marco Solano^a, Ernesto
5 Rojas^a, Alba Abras^e, Fabiola Gonzales^a, Yercin Mamani^{a,f}, Albert Arnau^{b,e}, Daniel Lozano^{a,c},
6 Joaquim Gascón^{d,g}, Faustino Torrico^{a,c}, Albert Picado^d, Carmen Muñoz^{h,i,j#}, Montserrat
7 Gállego^{b,d,g,#}

8 ^a Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia

9 ^b Secció de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia
10 i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

11 ^c Fundación CEADES y Medio Ambiente, Cochabamba, Bolivia

12 ^d Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), Barcelona, Spain

13 ^e Departament de Biologia, Universitat de Girona, Girona, Spain

14 ^f Epidemiology and Global Health, Umeå University, Umeå, Sweden.

15 ^g CIBERINFEC, ISCIII- CIBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III

16 ^h Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Barcelona, Barcelona, Spain

17 ⁱ Institut de Recerca Biomèdica Sant Pau, Barcelona, Spain

18 ^j Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

19 **Correspondence**

20 Mary Cruz Torrico, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. Av. Aniceto Arce
21 N° 371, Cochabamba, Bolivia. Email: mary.torrico@umss.edu

22 Montserrat Gállego, Secció de Parasitologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació,
23 Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII, 27–31, 08028 Barcelona, Spain. Email:
24 mgallego@ub.edu

25 *Cristina Ballart and Anna Fernández-Arévalo contributed equally to the work.

26 #Carmen Muñoz and Montserrat Gállego should be considered as joint senior authors.

27 ABSTRACT

28 In Bolivia, tegumentary leishmaniasis is routinely diagnosed by a Direct Parasitological Exam
29 using Giemsa staining and microscopic observation; axenic culture is performed only by
30 specialized laboratories with suitable infrastructure and trained personnel, whereas molecular tests
31 are limited to research or epidemiological studies due to their high cost and the absence of a gold
32 standard method. The aim of the present study was to optimize the parasitological diagnosis of
33 tegumentary leishmaniasis in Bolivia by evaluating the usefulness of different parasitological
34 techniques and sampling methods.

35 A total of 117 patients with suspected tegumentary leishmaniasis participated in the study. Two
36 methods were used simultaneously to obtain samples from each patient, aspirate and scraping the
37 edge of the main lesion, resulting in a total of 242 samples (four patients provided more than two).
38 The samples were processed in parallel by four different parasitological diagnostic techniques: a
39 direct parasitological exam, culture in TSTB medium, and miniculture and microculture in
40 Schneider's medium. Tegumentary leishmaniasis was confirmed in 96 patients (82%) by at least
41 one parasitological technique and one sampling method, which was considered the reference gold
42 standard. All four parasitological techniques had a specificity of 100% and their analytical
43 sensitivity was greater with scraping samples (45%, 98%, 94%, and 75%, respectively) than
44 spirates (32%, 90%, 89%, and 72%, respectively). Culture in TSTB medium and miniculture in
45 Schneider's medium using scraping samples correlated well with the gold standard (k -
46 Cohen=0.88) and showed good reliability α -Cronbach ≥ 0.91). Microculture in Schneider's
47 medium with both sampling methods provided positive results earlier than the other culture
48 methods (mean day 4.5, range of days 2 to 17). 98% of positive cultures in TSTB medium with
49 both sample types were detected by day 14. Scraping sampling and miniculture in Schneider's
50 medium were associated with higher culture contamination, bacteria being the predominant
51 contaminating organisms in all culture techniques evaluated (6% to 17%).

52 In conclusion, scraping samples proved more suitable for the diagnosis of tegumentary
53 leishmaniasis as they increased analytical sensitivity, are less traumatic for the patient and are safer
54 for laboratory personnel than aspirates. Culture, principally in TSBT medium, should be used for
55 the diagnosis of tegumentary leishmaniasis due to its high sensitivity compared to the other
56 parasitological methods studied and its low cost in comparison with the other culture media.

57 Keywords: tegumentary leishmaniasis, parasitological diagnosis, culture techniques, aspirate
58 sample, scraping sample, Bolivia.

59

60 1. Introduction

61 Leishmaniasis are zoonotic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Fifteen of
62 the 22 species of *Leishmania* affecting humans have been identified in the New World, where
63 leishmaniasis takes visceral, cutaneous, and mucosal clinical forms (OPS/OMS, 2019).
64 Tegumentary leishmaniasis (TL), which includes the cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL)
65 forms, is the most prevalent (Goto & Lauletta Lindoso, 2010). The clinical presentations of CL are
66 diverse, depending on the host, parasite, and vector involved (Bastien, 2011), which may lead to
67 confusion with other infections such as deep mycosis (paracoccidioidomycosis, sporotrichosis,
68 chromomycosis), lepra or mycobacteriosis, among others (Gomes et al., 2014). Thus, before
69 treatment can start, clinical suspicion of leishmaniasis needs laboratory confirmation, particularly
70 due to the toxicity of the available drugs (Ramirez et al., 2002).

71 The different laboratory methods for diagnosing TL have been widely reviewed (Aronson &
72 Joya, 2019; De Vries et al., 2015; De Vries & Schallig, 2022; Goto & Lauletta Lindoso, 2010).
73 They include techniques for the detection of parasites by microscopic examination of Giemsa-
74 stained smears (direct parasitological exam, DPE) and traditional culture of samples in different
75 media, including the biphasic Novy, McNeal and Nicolle's (NNN) and Torricco-Solano-Torricco-
76 Bermúdez (TSTB) media, and the monophasic (liquid) Schneider's *Drosophila* Medium (Aronson
77 & Joya, 2019; Bermúdez et al., 2005; Ashford, 2000). Other culture methods described are
78 microculture (MCC) and miniculture (MNC) in a monophasic culture medium (Allahverdiyev et
79 al., 2004; Boggild et al., 2007). Molecular techniques based on polymerase chain reaction, are also
80 used to detect parasitic DNA in leishmaniasis cases (De Paiva-Cavalcani et al. 2015; Reithinger et
81 al., 2007). Likewise, different samples are used for TL diagnosis according to the clinical form
82 (skin ulcers or lesions of the nasal and oral mucosa), which are obtained with different methods,
83 including aspirate or scraping the edge and/or center of the lesion (Aronson & Joya, 2019; Ramírez
84 et al., 2000; Reimão et al., 2020).

85 Serological diagnosis of TL is rare due to limited availability in most countries, as well as
86 potential lack of sensitivity associated with a poor humoral response. An additional concern is that
87 most serological tests are *in-house*, which can hinder quality control (Aronson & Joya, 2019;
88 Guedes et al., 2017). On the other hand, *Leishmania* skin tests are not confirmatory, and no
89 licensed tests are available (Carstens-Kass et al., 2021).

90 In Bolivia, seven of the nine departments are endemic for TL, with the highest number of
91 cases being reported from La Paz, Pando, Beni, and Cochabamba (Mnisterio de Salud de Bolivia,
92 2016). Most cases reported in 2019-2021 correspond to CL (87%) and the remaining 13% to MCL
93 (OPS, 2022). The diagnosis of TL in Bolivia is mainly based on DPE, with culture techniques
94 carried out only by specialized laboratories with the appropriate infrastructure and trained
95 personnel (Ballart et al., 2021), and molecular tests restricted to research purposes or
96 epidemiological studies due to their high cost (García et al., 2009). Thus, it is common for
97 diagnostic centers to choose a diagnostic test according to available infrastructure and resources
98 rather than for its accuracy (De Vries et al., 2015).

99

100 2. Material and methods

101 2.1. Patient recruitment

102 During the period 2017-2018, a total of 117 patients with suspected TL were attended at the
103 Tropical Medicine facility of the Faculty of Medicine, Universidad Mayor de San Simón (FM,
104 UMSS) in Cochabamba (Bolivia), where the clinical and epidemiological diagnosis was made by
105 a specialist in tropical medicine. The patients were then admitted to the LABIMED Parasitology
106 laboratory (FM, UMSS) for laboratorial diagnosis free of charge. To be included in the study, all
107 patients were requested (i) not to receive treatment for leishmaniasis in the month prior to sample
108 collection (Glucantime®, Pentostam®, amphotericin B, etc.), (ii) not to treat the lesions at home
109 with plants or chemical products, and (iii) to keep the lesions clean by washing with soap and
110 water to ensure samples free of pus and crusts.

111

112 2.2. Definitions

113 **Suspected case of CL:** Any person with one or more papules, nodules, or skin ulcers, without
114 a history of trauma, with an evolution time of more than two weeks, and with residence or history
115 of travel or stay in an endemic area of leishmaniasis (Ministerio de Salud de Bolivia, 2015).

116 **Suspected case of MCL:** Any person with ulcerative or granular lesions in the naso-oral-
117 pharyngeal region, including perforation or loss of the nasal septum, which may reach the lips and
118 mouth (palate and nasopharynx), with or without a history of previous ulcerative or scarring lesions

119 on the skin, and with residence or a history of travel or stay in an endemic area ([Ministerio de](#)
120 [Salud de Bolivia, 2015](#)).

121

122 *2.3. Inclusion and exclusion criteria*

123 All patients included in the study (117) voluntarily attended the Parasitology laboratory, had
124 a clinical and epidemiological history of TL according to a dermatologist, had received a
125 recommendation for confirmatory laboratory diagnosis by DPE and culture, and complied with the
126 aforementioned requirements prior to sampling.

127

128 *2.4. Sampling methods*

129 A total of 242 samples were taken by two sampling methods (121 aspirate and 121 scraping)
130 from the 117 patients recruited in the study (in four patients additional samples were taken from
131 another main lesion), following the protocol established in the LABIMED-IIBISMED Laboratory
132 of Parasitology ([Torrico-Rojas & Zubieta-Durán 2010](#)), to be used in the evaluation of the four
133 diagnostic laboratory techniques (DPE, classical culture in TSTB medium, and MNC and MCC in
134 Schneider's medium).

135 Scraping samples and aspirates were both obtained in triplicate from the edges of the same
136 lesions. Scraping was done with a sterile wooden applicator. To prepare the smears, the samples
137 were directly deposited on two clean and degreased slides, with three imprints per slide. To carry
138 out the cultures, a new sample was used. The wooden applicator was immersed in an Eppendorf
139 tube containing 1 ml of saline solution with 150 µg/ml gentamicin and the sample was
140 homogenized by rotation.

141 Aspirate samples were obtained by aspirating three times at three different sites of the most
142 raised edges of the lesion with a 23G 1.½" hypodermic needle and a 3 ml syringe. To perform the
143 cultures, the syringe was first filled with 0.5 ml of 0.9% saline solution with 150 µg/ml gentamicin.
144 Once the sample was obtained by aspiration, the entire content was transferred to a sterile
145 Eppendorf tube containing 0.5 ml of saline solution with 150 µg/ml gentamicin (final volume 1
146 ml). For the smear preparation, another syringe containing 50 µl of saline solution was used,

147 aspiration was carried out, and two smears were prepared (three aspirate imprints on each of the
148 slides with an approximate diameter of 0.8 to 1 cm).

149

150 2.5. Parasitological methods

151 2.5.1. Direct parasitological exam (DPE)

152 Once the imprints were dry, they were fixed with 96% alcohol for 5 minutes and stained with
153 Giemsa diluted 1/10 with distilled water pH 7.2 for 15 minutes. The slides were observed under
154 an optical microscope with a 100x objective using immersion oil. A sample was considered
155 positive when one or more amastigotes were observed in one of the slides.

156

157 2.5.2. Axenic culture in biphasic TSTB culture medium

158 A 500 μ l volume of aspirate or scraping sample was divided in sterile conditions between
159 three tubes of *in-house*-prepared TSTB culture medium containing 0.5 ml of saline solution with
160 an antibiotic (gentamicin 150 μ g/ml) (Bermúdez et al., 2005). The tubes were incubated in a
161 refrigerated oven at 24 to 26°C for 28 days (Faber et al., 2003), and the negative cultures were
162 reseeded to new culture media at days 7, 14 and 21. In parallel, microscopic observations were
163 performed at 400x, placing a drop of the supernatant between the slide and coverslip. The final
164 observation was done at day 28 of incubation after which the cultures were eliminated. The culture
165 was considered positive when one or more *Leishmania* promastigotes were detected in any of the
166 readings performed.

167

168 2.5.3. Miniculture (MNC) in Schneider's culture medium

169 For the MNC, a total volume of 300 μ L of aspirate or scraping sample was divided between
170 two sterile Eppendorf tubes containing 1.5 ml of culture medium, as in Boggild et al. (2008)
171 (Boggild et al., 2008), with the following modifications: use of Schneider's culture medium
172 (Sigma Life Science) supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 150
173 μ g/ml gentamicin, and 1% sterile human urine from a subject from an area non-endemic for TL.
174 The Eppendorf tubes were incubated in a refrigerated oven at 24 to 26°C for 28 days. Microscopic

175 observations were carried out at days 7, 14, 21 and 28, placing a drop of the supernatant between
176 a slide and a coverslip. After each reading, the subtracted volume was replaced with new culture
177 medium. The culture was considered positive when one or more *Leishmania* promastigotes were
178 detected in any of the readings performed.

179

180 *2.5.4. Microculture (MCC) in Schneider's culture medium*

181 For the MCC, a total volume of 100 μ L of aspirate or scraping sample was placed in a sterile
182 Eppendorf tube as in Boggild et al. (2007) (Boggild et al. 2007), with the following modifications:
183 use of Schneider's culture medium with 150 μ g/ml gentamicin supplemented with 20% FBS and
184 1% sterile human urine and homogenized by vortexing at low speed. Next, four sterile capillary
185 tubes without additives were filled by capillarity with 50 μ L of the mixture inside a biosafety
186 cabinet. Both ends of the tube were sealed with sterile plasticine. The tubes were placed inside a 5
187 ml hemolysis tube as a support to keep them in a vertical position and incubated at 24 to 26°C in a
188 refrigerated oven for 28 days. The reading of the tubes was carried out directly in the optical
189 microscope at 400x twice a week (at days 3 and 7), examining the entire surface of the tube and
190 moving the micrometer screw to visualize different levels of the culture. The MCC was considered
191 positive when one or more *Leishmania* promastigotes were detected in any of the capillary tubes
192 in any of the readings performed.

193

194 *2.6. Ethical aspects*

195 This study is part of a collaborative research project between ISGlobal (Barcelona, Spain)
196 and the CEADES Foundation (Cochabamba, Bolivia). The study protocol was approved by the
197 Ethics Committees of CEADES Health and Environment of Bolivia (CE-Leish-01-24092022). All
198 patients with suspected leishmaniasis provided written informed consent (parents or guardians in
199 the case of those under 18 years of age) before participating in the study.

200

201 *2.7. Analysis of results*

202 To evaluate the performance of the different diagnostic techniques, we considered as the gold
203 standard a positive laboratory result by any of the techniques evaluated using either of the two

204 sampling methods. Each lesion was considered as an independent unit of analysis (Boggild et al.,
205 2007). Cultures without observable growth of promastigotes showing microbial contamination
206 before the incubation process was concluded (28 days) were discarded but contaminated positive
207 cultures were not. Therefore, the final number of culture samples analyzed was variable (less than
208 121 for each culture technique).

209 The results were tabulated and analyzed using the IBM SPSS Statistics V.26 © program. The
210 following diagnostic accuracy measures were calculated: sensitivity, positive predictive value
211 (PPV), and negative predictive value (NPV), corresponding to the proportion of correctly
212 diagnosed individuals with positive (PPV) or negative results (NPV) (Izquierdo et al., 2013)
213 (calculated as $TP/[TP + FP]$ and $TN/[TN + FN]$, respectively) (TP, true positive; TN, true negative;
214 FP, false positive; FN, false negative). Also calculated was the Cohen's kappa correlation index
215 (k), which describes the level of concordance among tests, relating the observed agreement (Ao)
216 and the agreement calculated by chance (Ae) (calculated as $[Ao - Ae]/[1 - Ae]$) (Cerdeira et al., 2008).
217 For the interpretation of the k values, the table proposed by Landis & Koch was used (values > 0.8
218 indicate an almost perfect agreement, 0.61-0.8 substantial, and 0.41-0.6, moderate) (Landis &
219 Koch, 1977). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

220 Cronbach's alpha coefficient (α -Cronbach) was used to calculate reliability, which represents
221 the internal consistency of the test. The coefficient is obtained from the sum of the variance of the
222 individual sample and the sum of the variance of each evaluated test, where the variance is the
223 measure of the distance between the real and expected values. In general, an α -Cronbach value
224 higher than 0.7 or 0.8 is considered satisfactory, but in clinical application values between 0.9 and
225 0.95 are desirable (Bland & Altman, 1997; Cascaes et al., 2018). In the present study, k and α -
226 Cronbach were calculated for two purposes: to evaluate the techniques individually, according to
227 the two types of samples, taking into account the established gold standard, and to evaluate pairs
228 of techniques, with the aim of including the pair of techniques with the highest concordance and
229 reliability in the TL diagnosis.

230 The time of the different culture methods to positivity was analyzed, calculating the mean
231 time required to positivize (\pm standard deviation), and the range of positivity for the culture
232 techniques using the two sampling methods (aspirate and scraping). Finally, we analyzed the
233 contamination percentage of the culture techniques during processing, the percentage of positive

234 cultures contaminated, and the percentage of cultures discarded before the end of the incubation
 235 period, in which no parasitic growth was evidenced (factor of sample loss due to microbial
 236 contamination).

237

238 2. Results

239 Of the 117 patients included, 96 (82%) were confirmed to have TL by at least one of the
 240 parasitological techniques evaluated, with either the aspirate or scraping sample. The sensitivity
 241 of each parasitological technique evaluated is included in [Table 1](#).

Technique and sample	n pos/N	n Cont	S% (CI95%)	NPV% (CI95%)	PPV% (CI95%)	k ^{*,**}	α-Cronbach ^{**}
DPEA	32/121	N/A	32 (23-43)	25 (16-35)	100 (87-100)	0.15	0.43
DPES	45/121	N/A	45 (36-56)	29 (19-41)	100 (90-100)	0.23	0.52
TSTBA	88/119	2	90 (82-95)	68 (49-83)	100 (95-100)	0.75	0.87
TSTBS	96/112	9	98 (92-100)	88 (60-98)	100 (94-100)	0.88	0.94
MNCA	79/103	18	89 (80-94)	40 (23-63)	100 (94-100)	0.68	0.83
MNCS	79/98	23	94 (86-98)	74 (49-90)	100 (94-100)	0.82	0.91
MCCA	70/114	7	72 (62-81)	39 (25-54)	100 (94-100)	0.43	0.67
MCCS	70/107	14	75 (65-83)	38 (23-55)	100 (94-100)	0.44	0.67

242 **Table 1.** Statistical analysis of the four parasitological diagnostic techniques used in the study
 243 (DPE, TSTB, MNC, MCC) based on two sampling methods (aspirate: A and scraping: S) with
 244 regard to the reference gold standard.

245 **n** pos: number of positive samples, **N**: number of samples analyzed excluding contaminated
 246 samples without promastigote growth, **n** cont: number of contaminated samples, **S**: sensitivity, **CI**:
 247 confidence interval, **NPV**: negative predictive value, **PPV**: positive predictive value, **k**: Cohen's
 248 kappa index, **α-Cronbach**: α-Cronbach reliability test, **DPEA**: direct parasitological exam from
 249 aspirate, **DPES**: direct parasitological exam from scraping, **TSTBA**: TSTB medium culture from

250 aspirate, **TSTBS**: TSTB medium culture from scraping, **MNCA**: miniculture in Schneider’s
 251 medium from aspirate, **MNCS**: miniculture in Schneider’s medium from scraping, **MCCA**:
 252 microculture in Schneider’s medium from aspirate, **MCCS**: microculture in Schneider’s medium
 253 from scraping. N/A: does not apply. * All k values were statistically significant ($p < 0.05$). **Cohen's
 254 kappa test was used to assess the similarity between techniques and reliability, and Cronbach's
 255 alpha coefficients were expressed as intraclass correlation coefficients (ICCs).

256 All the techniques were more sensitive when using scraping samples, and culture in TSTB
 257 had the highest sensitivity (98%). All techniques showed a specificity of 100%. For DPE, the
 258 lowest correlation was obtained with the gold standard ($k \leq 0.23$), and the lowest α -Cronbach
 259 reliability coefficient (≤ 0.52). TSTB and MNC culture performed with scraping samples had the
 260 highest correlation with the gold standard ($k \geq 0.82$) and the best α -Cronbach reliability coefficient
 261 (≥ 0.91). All k values were statistically significant ($p < 0.05$).

262 The analysis of concordance (k) and reliability (α -Cronbach) by pairs of protocols
 263 (combinations of techniques and sampling methods) is shown in **Table 2**.

Technique	N	k ^{*,**}	α -Cronbach ^{**}	Technique	N	k ^{*,**}	α -Cronbach ^{**}
DPEA-DPES	121	0.72	0.85	TSTBA-MNCA	103	0.77	0.87
DPEA-TSTBA	119	0.23	0.53	TSTBA-MCCA	113	0.54	0.73
DPEA-MNCA	103	0.23	0.53	TSTBA-MNCS	98	0.85	0.92
DPEA-MCCA	114	0.20	0.41	TSTBA-MCCS	107	0.50	0.69
DPEA-TSTBS	112	0.13	0.40	TSTBS-MNCA	101	0.71	0.84
DPEA-MNCS	98	0.21	0.50	TSTBS-MCCA	108	0.37	0.60
DPEA-MCCS	107	0.21	0.43	TSTBS-MNCS	96	0.88	0.94
DPES-TSTBA	119	0.28	0.54	TSTBS-MCCS	102	0.38	0.61
DPES-MNCA	103	0.30	0.56	MNCA-MNCS	93	0.89	0.95
DPES-MCCA	114	0.35	0.55	MNCA-MCCA	100	0.57	0.74
DPES-TSTBS	112	0.19	0.47	MNCA-MCCS	97	0.55	0.72
DPES-MNCS	98	0.28	0.57	MNCS-MCCA	96	0.56	0.75
DPES-MCCS	107	0.38	0.61	MNCS-MCCS	90	0.66	0.81
TSTBA-TSTBS	111	0.73	0.85	MCCS-MCCA	105	0.56	0.72

264 **Table 2.** Statistical analysis of the results obtained (positive/negative) by pairs of diagnostic
 265 techniques (DPE, TSTB, MNC, MCC), using the two sampling methods (A: aspirate and S:
 266 scraping).

267 **N:** number of samples analysed excluding contaminated samples, **k:** Cohen’s kappa index, **α-**
 268 **Cronbach:** α-Cronbach reliability test, **DPEA:** direct parasitological examination from aspirate,
 269 **DPES:** direct parasitological examination from scraping, **TSTBA:** TSTB culture in TSTB medium
 270 from aspirate, **TSTBS:** culture in TSTB medium from scraping, **MNCA:** miniculture in
 271 Schneider’s medium from aspirate, **MNCS:** miniculture in Schneider’s medium from scraping,
 272 **MCCA:** microculture in Schneider’s medium from aspirate, **MCCS:** microculture in Schneider’s
 273 medium from scraping. *All k values were statistically significant (p<0.0001). **Cohen's kappa
 274 test was used to assess the similarity between techniques and reliability Cronbach's alpha
 275 coefficients were expressed as intraclass correlation coefficients (ICCs).

276 The DPE had very low concordance with all the culture techniques used, regardless of the
 277 sampling method (k≤0.38), whilst there was perfect agreement between the pairs of techniques
 278 TSTBA-MNCS, TSTBS-MNCS and MNCA-MNCS (k>0.8), with a very high reliability (α-
 279 Cronbach≥0.92).

280 The time elapsed between seeding the sample and microscopic observation of a positive
 281 culture varied depending on both the sample type and the culture technique, ranging between two
 282 and 28 days (**Table 3**). The detection of parasites was most rapid in MCC, especially with the
 283 scraping method (4.5 days ± 3.8 SD).

284 Regarding the percentage of positivity of the cultures and the incubation time, 77% of the
 285 cultures were positive at day 7 of incubation regardless of the culture medium or sampling method
 286 (**Table 3**). By day 14, the vast majority of positive results had been obtained, except for one TSTBS
 287 culture and one MNCS, which were positive in the last observation at day 28.

Sample/Culture		N	Mean ± SD	Median	Range	Time to positivity (%)			
						7 d	14 d	21 d	28 d
Aspirate	TSTB	88	7 ± 2.3	7	7-21	93	5	2	-
	MNC	79	8 ± 2.8	7	6-23	77	17	6	-
	MCC	70	6 ± 3.3	6	3-16	84	15	1	-

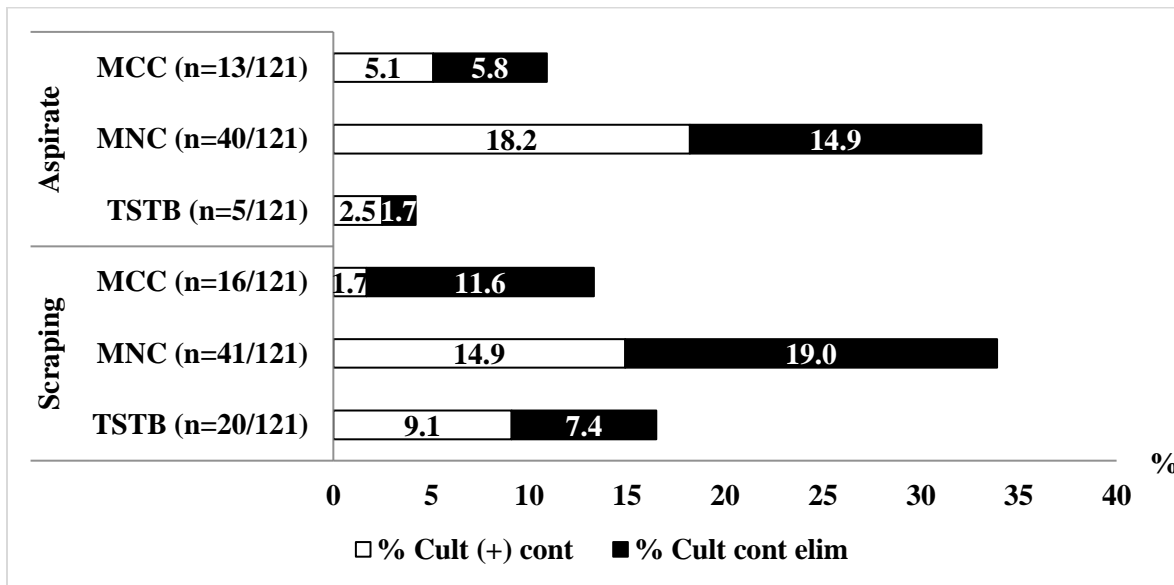
Scraping	TSTB	96	8 ± 3.5	7	7-28	83	15	1	1
	MNC	79	8 ± 3.8	7	5-28	81	15	3	1
	MCC	70	4.5 ± 3.8	4.5	2-17	86	7	7	-

288 **Table 3.** Time to positivity of culture techniques using samples collected by aspiration and
 289 scraping from suspicious lesions of tegumentary leishmaniasis.

290 **TSTB:** culture in TSTB medium; **MNC:** miniculture in Schneider’s medium; **MCC:** microculture
 291 in Schneider’s medium, **N:** number of samples; **SD:** standard deviation; **d:** day

292 A total of 363 cultures were carried out during the study using the three methods mentioned
 293 above (Figure 1). Contamination by microorganisms was observed in all the culture techniques
 294 evaluated, including in positive cultures (8.5%, 31/363). Scraping sample cultures showed greater
 295 contamination (21%, 77/363) than aspirate cultures (16%, 58/363). The TSTBA culture was the
 296 method with least contamination (4%, 5/121) and MNC had the most (aspirate: 33%, 40/121 and
 297 scraping 34%, 41/121).

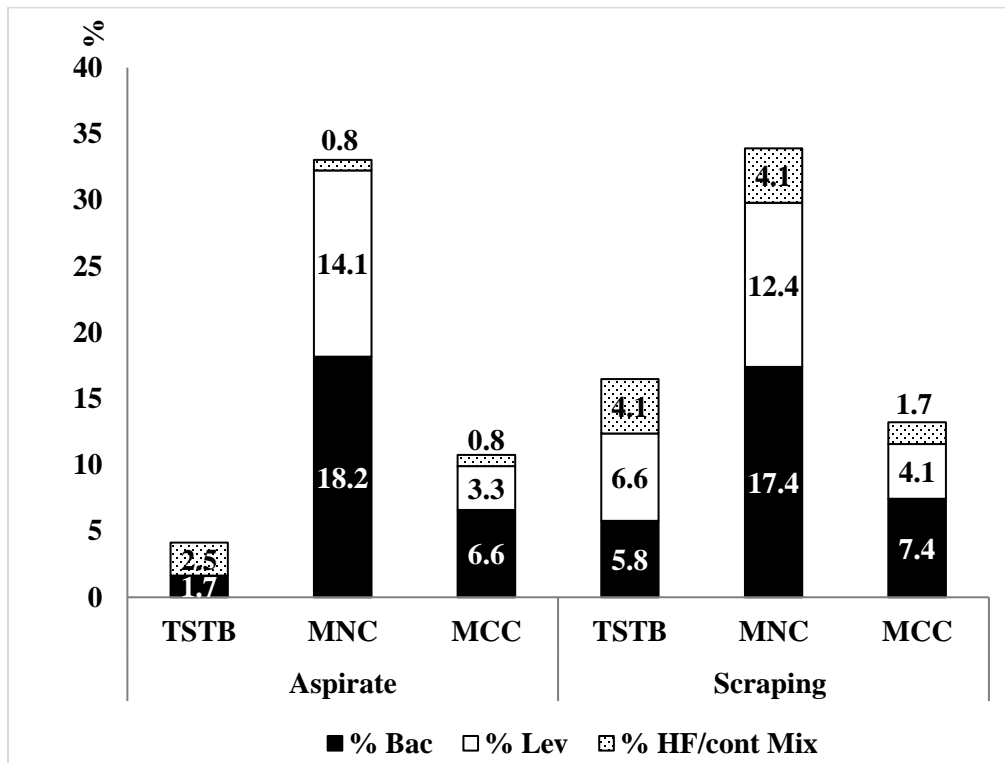
298 A higher percentage of scraping sample cultures were lost (12.7%, 46/363) than aspirate
 299 cultures (7.4%, 27/363). MNC presented the highest percentage of loss with both sampling
 300 methods (**Fig. 1**).



301 **Fig. 1.** Percentage of culture contamination according to the sampling method and the culture
 302 technique used for diagnosis of tegumentary leishmaniasis.
 303

304 **n**: number of cultures contaminated/121 cultures carried out, % Cult (+) Cont: percentage of
 305 cultures showing contamination and positive for *Leishmania* promastigotes; % Cult cont elim:
 306 percentage of cultures showing contamination that were discarded; **TSTB**: culture in TSTB
 307 medium; **MNC**: miniculture in Schneider’s medium; **MCC**: microculture in Schneider’s medium.

308 Bacterial contamination predominated, regardless of the sampling and culture method (**Fig.**
 309 **2**). Filamentous fungi and mixed contamination were more frequently observed in cultures from
 310 scraping samples.



311
 312 **Fig. 2.** Percentage of contaminated cultures according to sampling method, culture technique,
 313 and contaminating microorganisms.

314 **% Bac**: percentage of bacteria contamination, **% Lev**: percentage of yeasts contamination; **%**
 315 **HF/cont Mix**: percentage of filamentous fungi/mixed contamination; **TSTB**: culture in TSTB
 316 medium; **MNC**: miniculture in Schneider’s medium; **MCC**: microculture in Schneider’s
 317 medium

318
 319 **4. Discussion**

320 The method of sampling for the parasitological diagnosis of TL, whether aspiration,
321 scraping, or biopsy of the lesion edge or center, affects the sensitivity of the detection method
322 (OMS, 2010; OPS/OMS, 2019). The technique most applied in Bolivia is the DPE-Giemsa stain,
323 which is reported to have 37% sensitivity with scraping samples from the edge of the lesion
324 (Ministerio de Salud de Bolivia, 2015). Despite its low sensitivity, this method is widely used due
325 to its low cost, speed, simplicity, and high specificity (Aronson and Joya 2019; Reithinger &
326 Dujardin, 2007). Although the DPE is accessible for any type of laboratory, its sensitivity varies
327 considerably according to the experience of the laboratory staff and sample quality (Cantanhêde,
328 et al., 2021; Mann, et al. 2021).

329 The aim of the present study was to analyze the whole process of TL diagnosis, from the
330 sampling method to the parasitological techniques. Following the Pan American Health
331 Organization (PAHO) recommendations (PAHO, 2019), samples were taken from the edge of the
332 lesion. Two types of sample were simultaneously collected from each of the 117 Bolivian patients
333 participating in the study, using aspiration (A) and scraping (S) methods, to compare their
334 suitability. Four different parasitological methods (DPE and culture in different media) were
335 studied in parallel with each sample. Biopsy samples were not collected because the procedure is
336 more invasive and traumatic for the patient and should only be carried out when another etiology
337 needs to be studied (Aronson et al., 2016). For ethical reasons, we aimed to cause the minimal
338 inconvenience for the patients voluntarily taking part in the research.

339 According to the gold standard, 96 of the 117 (82%) patients suspected of having TL were
340 diagnosed with the disease, verifying the correctness of the clinical diagnosis. Nevertheless, the
341 different techniques showed different levels of accuracy. Both DPEA and DPES had low
342 sensitivity ($\leq 45\%$) and poor correlation with the gold standard ($k \leq 0.23$). Contradictory results have
343 been reported for DPE sensitivity, which is generally lower in the New than the Old World (Goto
344 & Lauletta Lindoso, 2010; Reimão et al., 2020). In studies carried out in Iran and Lebanon, the
345 sensitivity range was 38-89% (Hosseinzadeh et al., 2012; Pezeshkpoor et al., 2013; Saab et al.,
346 2015), compared to 27.9-85% reported in Argentina, Brazil, Colombia, Mexico, and Peru (Boggild
347 et al., 2007, 2008, 2010; Cantanhêde et al., 2021; De Almeida, et al., 2021; De Mello et al., 2011;
348 Marco et al., 2012; Ramírez, et al., 2002; Weigle et al., 1987). However, it is difficult to compare
349 DPE sensitivity results in the literature because of variability in sampling, including the utensils
350 used (lancet, scalpel, toothpick, punch, cytology brushes, needle, or fine needle), the location (the

351 edge, induration borders, or the center of a recent or older lesion), and methods (aspiration,
352 scraping or biopsy) as well as the training level of the staff. An advantage of the present study is
353 that these variables were eliminated, as all the samples were collected by the same person and the
354 different methods were applied to the same lesions. Another important factor that could affect DPE
355 sensitivity is the *Leishmania* species responsible for the lesion. For example, a study in Brazil
356 reported sensitivities of 24% when *L. braziliensis* was the causal agent and 93% in the case of *L.*
357 *guyanensis* (Romero et al., 2001). Accordingly, an explanation for the low DPE sensitivity
358 obtained in the present study is that in Bolivia 90% of lesions in TL are caused by *L. braziliensis*
359 (García et al. 2007; Torrico et al., 2021).

360 Culture usually improves sensitivity in TL diagnosis (Reimão et al., 2020; Thakur et al.,
361 2020), although a study in Colombia reported that aspiration cultures in NNN medium were
362 negative for patients with a positive DPE (Ramírez et al., 2000). Despite its high sensitivity, culture
363 is not used in routine clinical practice in Bolivia. When analyzing the results of the three culture
364 techniques tested (TSTB, MNC and MCC), their sensitivity was always higher compared to the
365 DPE, regardless of the sampling method, ranging from 72% to 98%. This indicates that to optimize
366 TL diagnosis, culture techniques applied by trained personnel should be used. Another advantage
367 of culture-based methods is that the parasite can be isolated for subsequent research, including
368 parasite identification (Boggild et al., 2008; Reimão et al., 2020).

369 The TSTBS culture had the highest sensitivity (98%), followed by MNCS (94%), both
370 showing complete agreement with the gold standard ($k=0.88$ and $k=0.82$, respectively). These
371 results could be explained by the larger volume of sample used (500 μ l and 300 μ l, respectively)
372 compared to the other culture method (MCC) (100 μ l). The TSTBA technique, which showed a
373 good level of sensitivity (90%), is currently used in the Bolivian Laboratory of Parasitology of the
374 FM UMSS for TL diagnosis, as well as to isolate *Leishmania* spp. Similar results were obtained
375 for this method in previous studies in Bolivia by members of our group, with up to 91% sensitivity
376 obtained with aspirate sampling (Ballart et al., 2021; Bermúdez et al., 2005). In contrast, other
377 studies, mostly based on samples obtained by aspiration and cultured in NNN or Schneider's
378 media, have reported lower sensitivities, ranging from 40 to 84% (Faber et al., 2003; Gomes et al.,
379 2014; Goto & Lauletta Lindoso, 2010, Pena et al., 2020). We were unable to find data on studies
380 using scraping samples for TL diagnosis by culture.

381 Our results showed that the sensitivity of MNC in Schneider's medium with 20% FBS
382 (MNCS: 94% and MNCA: 89%) was comparable to that of TSTB culture (TSTBS: 98% and
383 TSTBA: 90%). Both culture media with scraping samples provided results that were almost
384 perfectly correlated with the gold standard, and their reliability was more than satisfactory ($k > 0.8$;
385 α -Cronbach > 0.9). In a study carried out in Peru, MNC in RPMI 1640 medium with 20% FBS
386 using aspirate sampling showed a lower sensitivity (76.3%) (Boggild et al., 2008). On the other
387 hand, MCC with Schneider's medium supplemented with 20% FBS showed the lowest sensitivity
388 in TL diagnosis among the culture techniques (MCCA: 72% and MCCS: 75%), with moderate k
389 values. These results could be explained by the smaller sample volume used (100 μ l), as
390 mentioned, and a possible inhomogeneity of parasite distribution in the sample. Also, it has been
391 reported that liquid culture media such as Schneider's medium is not very effective for the isolation
392 of *L. braziliensis* strains, the most prevalent species in Bolivia, although it is useful for obtaining
393 mass cultures (Netto, et al., 1986). Studies in Peru on cutaneous lesions using MCC with aspirate
394 sampling report a sensitivity of 72 to 85%, similar to our results, although they used RPMI medium
395 supplemented with 10% and 20% FBS, respectively (Boggild et al., 2007; 2008). In contrast,
396 studies in the Old World (Ethiopia, Iran and Turkey) report a better performance of MCC (RPMI
397 + 10-15% FBS) (sensitivity of 91 to 98%) regardless of whether the sample was obtained by
398 aspiration or scraping (Aberra et al., 2019; Allahverdiyev et al., 2004). Once again, the *Leishmania*
399 species could be responsible for the lower sensitivity in the New World.

400 All the cultures in the study were maintained for 28 days. MCC gave positive results earlier
401 than the other methods, especially with scraping samples (day 4.5 ± 3.8 , range of 2- 17 days). An
402 explanation is that the MCCs were read more frequently than other cultures (every 3-4 days instead
403 of 7 days), as the capillary tubes do not need to be opened and can be directly observed under the
404 microscope. Other studies in the New World report a similar precocity for MCC, obtaining
405 positivity even earlier when using RPMI (at day 3.4 - 4.2, with ranges from 2-7 to 2-11 days), and
406 slightly later in the traditional NNN medium (at day 5.2 or 6.,7 with ranges from 3-13 to 3-17 days
407 (Aberra et al., 2019; Boggild et al., 2007; 2008;). Notably, in the MCC found positive 2 or 3 days
408 after inoculation, promastigotes were frequently observed emerging from macrophages at the
409 bottom of the capillary tube. As the incubation time progressed, the promastigotes were released
410 and migrated toward the surface of the tube, where they became anchored and multiplied, forming

411 easily detectable rosettes of mobile promastigotes. This evolution indicates that the entire surface
412 of the capillary tube warrants a detailed observation.

413 The percentage of positivity increased with culture time. Although a large percentage (84%)
414 of the cultures were positive at day 7, it was higher at days 14 and 21 and had even grown slightly
415 at day 28, which suggests the cultures should be maintained for this length of time. A similar study
416 in Brazil reported 85% positivity at day 7, 15% at day 14, and no new positive results at day 21
417 (Profeta Luz et al., 2009). As in the present study, the highest percentage of positive cultures were
418 detected in the first week, but our results differ in that 1 - 7% of the positive cultures were obtained
419 by one of the culture techniques at day 14, and 1% were obtained at day 28 of incubation in TSTBS
420 and MNCS. Based on these findings, it would be advisable to reseed the cultures for a final reading
421 at day 28 to capture the largest number of positive cultures, including slow-growing *Leishmania*
422 spp. strains (Montealegre, 2010), especially when there is no access to more sensitive diagnostic
423 alternatives.

424 Another factor that can affect the sensitivity and speed of obtaining results by culture is
425 contamination of skin lesions with bacteria or fungi (Aronson and Joya, 2019). To reduce this risk,
426 the participants of the present study were included on the condition that they maintained lesions
427 clean prior to the sampling (with soap and water and disinfection with sterile saline solution
428 containing the antibiotic gentamicin 150 µg/ml) (Bermúdez et al., 2005). Nevertheless,
429 contaminated cultures were observed, regardless of culture technique or sampling method (Weigle
430 et al., 1987). The contamination was more frequent in cultures from scraping samples (21%,
431 77/363) than aspirates (16%, 58/363), in agreement with Montealegre S. (2010), but sensitivity
432 increases with scraping samples regardless of the culture technique used. It is noteworthy that
433 MNC was the method with the highest percentage of contamination (33% and 34% in MNCA and
434 MNCS, respectively), although this did not affect its performance, which was reliable and in
435 agreement (between good and perfect) with the gold standard. The higher percentage of
436 contamination could be due to the use of Schneider's culture medium + 20% of FBS, which is
437 more enriched than TSTB, and the repeated opening of the Eppendorf tubes to observe the parasites
438 between slides and coverslips under the microscope. In contrast, MCC carries less risk of
439 contamination, as the cultures can be observed directly through the capillary tubes.

440 Regarding the contaminating microorganisms, bacteria were detected in all the media.
441 Yeasts were also observed, as were mixed contaminations (bacteria, yeasts and/or filamentous

442 fungi), but to a lesser extent. Another study in Bolivia reported a contamination rate of 6.7% for
443 cultures in TSTB based on aspirate samples, fungi being the main contaminant (Ballart et al.,
444 2021). In the present study the contamination of the TSTBS culture (16%) apparently did not affect
445 its sensitivity, with promastigotes observed in 98%, and only 7% (9/121) of the cultures had to be
446 discarded. In comparison, the TSTBA cultures showed less contamination (4%), so their lower
447 sensitivity (90%) could be more related to the amastigote concentration in the inoculated sample.

448

449 5. Conclusions

450 Scraping the edges of the lesion is more useful than aspiration for the diagnosis of TL, either
451 by DPE or culture. DPE is a useful technique for TL diagnosis in Bolivia due to its low cost, safety
452 for laboratory personnel, and accessibility for simple laboratories. However, diagnosis by culture
453 should be implemented whenever possible, as culture in TSTB medium was found to double the
454 number of positive cases diagnosed by DPE. It is therefore recommended that the personnel of
455 second and third level laboratories in Bolivia should be trained to implement this technique. When
456 not possible, the sampling and PDE could be carried out “in situ” and part of the samples sent in
457 suitable conditions to a nearby laboratory equipped to carry out the culture.

458

459 CRediT authorship contribution statement

460 **Mary Cruz Torrico:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Original Draft,
461 Writing - Review & Editing, Visualization. **Cristina Ballart:** Methodology, Investigation, Writing
462 - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization. **Anna Fernández-Arévalo:**
463 Methodology, Investigation, Writing - Review & Editing, Visualization. **Marco Solano:**
464 Investigation, Writing - Review & Editing. **Ernesto Rojas:** Methodology, Writing - Review &
465 Editing. **Alba Abras:** Software, Formal analysis, Writing - Review & Editing. **Fabiola Gonzales:**
466 Methodology, Resources, Writing - Review & Editing. **Yercin Maman:** Formal analysis, Data
467 Curation, Writing - Review & Editing. **Albert Arnau:** Investigation, Writing - Review & Editing.
468 **Daniel Lozano:** Formal analysis, Writing - Review & Editing. **Joaquim Gascón:** Writing -
469 Review & Editing. **Albert Picado:** Resources, Writing - Review & Editing. **Faustino Torrico:**
470 Conceptualization, Resources, Project administration, Writing - Review & Editing. **Carmen**
471 **Muñoz:** Conceptualization, Investigation, Resources, Writing - Original Draft, Writing - Review

472 & Editing, Visualization. **Montserrat Gállego**: Conceptualization, Investigation, Resources,
473 Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Project administration.

474

475 **Acknowledgements**

476 The work carried out in Bolivia was supported by CEADES and Environment and AECID
477 (14-CO1-558). The participating UB and ISGbobal investigators are part of the GREPIMER group
478 (Grup de Recerca en Patologia Importada i Malaties Emergents i Re-emergents), which received
479 support from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR, 2017 SGR 924).
480 ISGlobal research was supported by the Tropical Disease Cooperative Research Network (RICET)
481 (RD12/0018/0010) and by CIBER -Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red- (CB
482 2021), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and Unión Europea –
483 NextGenerationEU. We acknowledge support from the Spanish Ministry of Science and
484 Innovation and State Research Agency through the “Centro de Excelencia Severo Ochoa 2019-
485 2023” Program (CEX2018-000806-S), and support from the Generalitat de Catalunya through the
486 CERCA Program”.

487 The authors would like to thank all the staff of LABIMED and IIBISMED for their support
488 in the study.

489

490 **References**

491 Abera, L., Abera, A., Belay, T., Kebede, A., Gadisa, E., & Tasew, G. (2019). Evaluation of
492 microcapillary culture method for the isolation of *Leishmania aethiopica* parasites from
493 patients with cutaneous lesions in Ethiopia. *Diagn progn res*, 3(1), 1–8.
494 <https://doi.org/10.1186/s41512-019-0051-z>.

495 Allahverdiyev, A.M., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M., & Memisoglu, H.R. (2004). A sensitive
496 new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*,
497 70(3), 294–297. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.294>.

498 Aronson, N., Herwaldt, B.L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Magill, A.
499 (2016). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the
500 Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical
501 Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis*, 63(12), E202–E264.
502 <https://doi.org/10.1093/cid/ciw670>.

- 503 Aronson, N., & Joya, C.A. (2019). Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and
504 Management. *Infect Dis Clin North Am*, 33(1), 101–117.
505 <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>.
- 506 Ashford R. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*,
507 30:1269–1281. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00136-3).
- 508 Ballart, C., Torrico, M.C., Vidal, G., Torrico, F., Lozano, D., Gallego, M., Picado, A. (2021).
509 Clinical and immunological characteristics of tegumentary leishmaniasis cases in Bolivia.
510 *PLoS Negl Trop Dis*, 15(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009223>.
- 511 Bastien, P. (2011). Leishmaniasis control: What part for development and what part for research?
512 *Clin. Microbiol. Infect.*, 17, 1449–1450. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03588.x>.
- 513 Bermudez, H., Solano, M., Torrico, M.C., Carballo, M., La Fuente, O., Lara, M., & Paredes, P.
514 (2005). Diagnóstico de Leishmaniasis Utilizando Medio de Cultivo TSTB en Pacientes del
515 Trópico de Cochabamba. *Gac Med Bol*, 28(2), 31–35. Retrieved from
516 [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-
517 29662005000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662005000200006&lng=es&tlng=es).
- 518 Bland, M., & Altman, D. (1997). Statistics notes: Cronbach's alpha. *BMJ-Brit Med J*, 314(7080),
519 572. <https://doi.org/10.1136/bmj.314.7080.570>.
- 520 Boggild, A.K., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Adui, V., Tulliano, G., Low,
521 D.E. (2007). Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from
522 cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol*, 45(11), 3680–3684.
523 <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-07>.
- 524 Boggild, A.K., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Martinez-Medina, D., Llanos-
525 Cuentas, A., & Low, D.E. (2008). Optimization of microculture and evaluation of
526 miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. *Am J*
527 *Trop Med Hyg*, 79(6), 847–852. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.847>.
- 528 Boggild, A.K., Ramos, A. P., Espinosa, D., Valencia, B.M., Veland, N., Miranda-Verastegui, C.,
529 Llanos-Cuentas, A. (2010). Clinical and demographic stratification of test performance: A
530 pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis.
531 *Am J Trop Med Hyg*, 83(2), 345–350. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0414>.
- 532 Cantanhêde, L.M., Mattos, C.B., Cruz, A. K., Ikenohuchi, Y.J., Fernandes, F.G., Medeiros, E.H.R.
533 T., Ferreira, R. de G.M. (2021). Overcoming the negligence in laboratory diagnosis of

- 534 mucosal leishmaniasis. *Pathogens*, 10(9), 1116.
535 <https://doi.org/10.3390/pathogens10091116>.
- 536 Carstens-Kass, J., Paulini, K., Lypaczewski, P., & Matlashewski, G. (2021). A review of the
537 leishmanin skin test: A neglected test for a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 15(7),
538 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009531>.
- 539 Cascaes, F., Gonçalves, E., Valdivia, B.A., Bento, G.G., Da Silva, T.L., Soleman, S.S., & Da Silva,
540 R. (2018). Estimators of Internal Consistency in Health Research: The Use of the Alpha
541 Coefficient. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1), 129–138. Retrieved from
542 <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v32n1/a19v32n1.pdf> .
- 543 Cerda Lorca, J., & Villarroel Del P., L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en
544 investigación pediátrica: Coeficiente de kappa. *Rev Chil Pediatr*, 79(1), 54–58.
545 <https://doi.org/10.4067/s0370-41062008000100008>.
- 546 De Almeida, J.V., De Souza, C.F., Fuzari, A.A., Joya, C.A., Valdivia, H. , Bartholomeu, D.C., &
547 Brazil, R.P. (2021). Diagnosis and identification of *Leishmania* species in patients with
548 cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil’s Amazon Region. *Parasites Vectors*,
549 14(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04539-8>.
- 550 De Mello, C.X., De Oliveira Schubach, A., De Oliveira, R.V.C., Conceição-Silva, F., Pimentel,
551 M.I. F., Lyra, M.R., Vasconcellos, E.C., De Fátima Madeira, M. (2011). Comparison of the
552 sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary
553 leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res*, 109(3), 927–933.
554 <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2335-2>.
- 555 De Paiva-Cavalcanti, M., De Moraes, R.C.S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L.A.M.,
556 Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H C., Brelaz-de-Castro, M. C., Silva,
557 R.deF.,Pereira, V R.A. (2015). Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of
558 immunological and molecular tools. *Cell Biosci*, 5(1), 1–10. [https://doi.org/10.1186/s13578-](https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2)
559 [015-0021-2](https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2).
- 560 De Vries, H.J C., Reedijk, S.H., & Schallig, H.D.F.H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent
561 Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol*, 16(2), 99–109.
562 <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>.

- 563 De Vries, H. J. C., & Schallig, H. D. (2022). Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative
564 Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol*, 23(6), 823–
565 840. <https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8>.
- 566 Faber, W.R., Oskam, L., van Gool, T., Kroon, N.C.M., Kneegt-Junk, K.J., Hofwegen, H., van der
567 Wal, A. C., Kager, P. A. (2003). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis.
568 *J Am Acad Dermatol*, 49(1), 70–74. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.492>.
- 569 García, A.L., Parrado, R., Rojas, E., Delgado, R., Dujardin, J.C., & Reithinger, R. (2009).
570 Leishmaniasis in Bolivia: Comprehensive review and current status. *Am J Trop Med Hyg*,
571 80(5), 704–711. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2009.80.704>.
- 572 Garcia, A.L., Tellez, T., Parrado, R., Rojas, E., Bermudez, H., & Dujardin, J. C. (2007).
573 Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular
574 characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of
575 Bolivia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 101(12), 1208–1213.
576 <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.002>.
- 577 Gomes, C.M., de Moraes, O.O., Roselino, A.M., de Paula, N.A., Soares, K.A., & Sampaio, R.N.R.
578 (2014). Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An*
579 *Bras Dermatol*, 89(5), 701–709. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142389>.
- 580 Goto, H., & Lauletta Lindoso, J.A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and
581 mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti-Infect Ther*, 8(4), 419–433.
582 <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>.
- 583 Guedes, D.C., Minozzo, J.C., Pasquali, A.K.S., Faulds, C., Soccol, C.R., & Thomaz-Soccol, V.
584 (2017). New strategy to improve quality control of Montenegro skin test at the production
585 level. *Rev Soc Bras Med Trop*, 50(6), 788–794. [https://doi.org/10.1590/0037-8682-0131-](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0131-2017)
586 [2017](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0131-2017).
- 587 Hosseinzadeh, M., Omidifar, N., & Lohrasb, M.H. (2012). Use of fine needle aspiration cytology
588 in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the conventional scraping
589 method. *Trop Doct*, 42(2), 112–113. <https://doi.org/10.1258/td.2011.110420>.
- 590 Izquierdo, L., Marques, A. F., Gállego, M., Sanz, S., Tebar, S., Riera, C., Gascon, J. (2013).
591 Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of
592 *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(7), 928–
593 931. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130112>.

- 594 Landis, J.R., & Koch, G.G. (1977). The Measurement of Observer Agreement for Categorical
595 Data. *Biometrics*, 33(1), 159. <https://doi.org/10.2307/2529310>.
- 596 Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A. F., Newman, S., Ramanan, P., & Suarez,
597 J.A. (2021). A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr*
598 *Trop Med Rep*, 8(2), 121–132. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>.
- 599 Marco, J.D., Barroso, P.A., Mimori, T., Locatelli, F.M., Tomatani, A., Mora, M.C., Cajal, S.P.,
600 Nasser, J.R., Parada, L.A., Taniguchi, T., Korenaga, M., Basombrío, M. A., & Hashiguchi,
601 Y. (2012). Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American
602 tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from
603 Argentina. *BMC Infect Dis*, 12(May). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-191>.
- 604 Ministerio de salud de Bolivia. (2015). Norma nacional y manual de procedimientos técnicos de
605 leishmaniasis. Retrieved September 23, 2020, from Serie: Documentos Técnicos
606 Normativos No 364 website:
607 <https://www.minsalud.gob.bo/images/Documentacion/dgss/Epidemiologia/Leishmaniasis/3>
608 [65-Norma Nacional y Manual de Procedimientos Tcnicos de Leishmaniasis-2015.pdf](https://www.minsalud.gob.bo/images/Documentacion/dgss/Epidemiologia/Leishmaniasis/365-Norma Nacional y Manual de Procedimientos Tcnicos de Leishmaniasis-2015.pdf).
- 609 Ministerio de Salud de Bolivia. (2016). Anuario Epidemiología 2016. Programa Nacional de
610 Vigilancia y Control de Leishmaniasis. Retrieved from
611 [https://www.minsalud.gob.bo/component/jdownloads/?task=download.send&id=99&catid](https://www.minsalud.gob.bo/component/jdownloads/?task=download.send&id=99&catid=9&m=0&Itemid=646)
612 [=9&m=0&Itemid=646](https://www.minsalud.gob.bo/component/jdownloads/?task=download.send&id=99&catid=9&m=0&Itemid=646).
- 613 Montealegre Santa., I.A. (2010). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de
614 leishmaniasis. *Nova*, 8(14), 128–132. <https://doi.org/10.22490/24629448.444>.
- 615 Netto, E.M., Cuba Cuba, C.A., Costa, J. L., Barreto, A.C., & Marsden, P.D. (1986). El método de
616 cultivo “in vitro” como instrumento práctico para el diagnóstico y aislamiento primario de
617 *Leishmania braziliensis braziliensis*. I. Observaciones de laboratorio.
618 *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 19(2), 79–84. [https://doi.org/10.1590/S0037-](https://doi.org/10.1590/S0037-86821986000200005)
619 [86821986000200005](https://doi.org/10.1590/S0037-86821986000200005).
- 620 OMS. (2010). Control de las Leishmaniasis.: Serie de Reportes Técnicos. In Ginebra. Ed. OMS
621 (Vol. 949). Retrieved from
622 [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf;jsessionid](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf;jsessionid=36BB9BAFF6094D06B7331BAA3A60AB40?sequence=1)
623 [=36BB9BAFF6094D06B7331BAA3A60AB40?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf;jsessionid=36BB9BAFF6094D06B7331BAA3A60AB40?sequence=1).
- 624 OPS/OMS. (2019). Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en

- 625 las Américas. In OPS/OMS. Retrieved from
626 https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf.
- 627 OPS. (2022). Leishmaniasis: Informe epidemiológico en las Américas. N° 11. Retrieved from
628 http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417%3A2012
629 [-leishmaniasis-cutanea-mucosa&catid=3940%3Anid-content-](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417%3A2012)
630 [general&Itemid=39345&lang=es%0Awww.paho.org](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417%3A2012).
- 631 Pena, H. P., Belo, V. S., Xavier-Junior, J. C. C., Teixeira-Neto, R. G., Melo, S. N., Pereira, D. A.,
632 de Campos Fontes, I., Morselli Santos, I., Valadares Lopes, V., Luiz Tafuri, W.L., Sierra
633 Romero, G.A. & da Silva, E. S. (2020). Accuracy of diagnostic tests for American
634 tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses. *Trop Med Int*
635 *Health*, 25(10), 1168–1181. <https://doi.org/10.1111/tmi.13465>.
- 636 Pezeshkpoor, F., Tohidi, M., Layegh, P., & Shahabi, M. (2013). Comparison of fine needle
637 aspiration and direct skin smear in the diagnosis of acute cutaneous leishmaniasis:
638 Polymerase chain reaction as a reference method. *Iran J Dermatol*, 16(64), 45–48. Retrieved
639 from http://www.iranjd.ir/article_98186_bdcec589b4ca3a9e43034ac11e773612.pdf .
- 640 Profeta Luz, Z., Rotondo da Silva, A., de Oliveira Silva, F., Caligiorne, R., Oliveira, E., & Rabello,
641 A. (2009). Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from
642 patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(1), 62–66.
643 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000100010>.
- 644 Ramírez, J., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, J.F., Berberich, C., Barker, D.C., & Vélez, I.D.
645 (2002). The method used to sample ulcers influences the diagnosis of cutaneous
646 leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 96(Suppl. 1), S169.
647 [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90071-4](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90071-4).
- 648 Ramirez, J.R., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, J.F., Berberich, C., Barker, D., & Velez, I.D.
649 (2000). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: The sampling site within lesions
650 influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol*, 38(10), 3768–3773.
651 <https://doi.org/10.1128/jcm.38.10.3768-3773.2000>.
- 652 Reimão, J.Q., Coser, E.M., Lee, M. R., & Coelho, A.C. (2020). Laboratory diagnosis of cutaneous
653 and visceral leishmaniasis: Current and future methods. *Microorganisms*, 8, 1–30.
654 <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111632>.

- 655 Reithinger, R., & Dujardin, J.C. (2007). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and
656 Future Applications. *J Clin Microbiol*, 45(1), 21–25. <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>.
- 657 Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007).
658 Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8).
- 659
- 660 Romero, G.A.S., De Farias Guerra, M.V., Paes, M.G., & De Oliveira Macêdo, V. (2001).
661 Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.)*
662 *guyanensis* in Brazil: Clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis*, 32(9),
663 1304–1312. <https://doi.org/10.1086/319990> ..
- 664 Saab, M., El Hage, H., Charafeddine, K., Habib, R.H., & Khalifeh, I. (2015). Diagnosis of
665 cutaneous leishmaniasis: Why punch when you can scrape? *Am J Trop Med Hyg*, 92(3),
666 518–522. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0512>.
- 667 Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of
668 parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis*, 44(2), 253–272.
669 <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>.
- 670 Torrico, M., Fernández-Arévalo, A., Ballart, C., Solano, M., Rojas, E., Ariza, E., Tebar, S.,
671 Lozano, D., Abras, A., Gascón, J., Picado, A., Muñoz, C., Torrico, F., & Gállego, M. (2021).
672 Tegumentary leishmaniasis by *Leishmania braziliensis* complex in Cochabamba, Bolivia
673 including the presence of *L. braziliensis* outlier: Tegumentary leishmaniasis in Cochabamba,
674 Bolivia. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 1–14. <https://doi.org/10.1111/tbed.14228>.
- 675 Torrico, M., & Zubieta, M. (2010). Manual de normas y procedimientos técnicos de laboratorio
676 (para Leishmaniasis). Serie de Documentos Técnicos. La Paz: Ministerio de Salud y
677 Deportes.
- 678 Weigle, K.A., de Davalos, M., Heredia, P., Molineros, R., Saravia, N.G., & D’Alessandro, A.
679 (1987). Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A
680 comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg*, 36(3), 489–496.
681 <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.489>.
- 682

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

La historia de la LT en las Américas data de millones de años, cuando afectaba a animales salvajes, y los primeros registros que se tienen de la enfermedad en el ser humano provienen de piezas de cerámica peruana, ecuatoriana y colombiana del año 400 al 900 d.C. que muestran una mutilación extrema de la región nasal, similar a la producida por las lesiones mucosas que se observan actualmente en los pacientes (Shaw, 2020). Hasta el momento, en el continente americano, se ha detectado la presencia de leishmaniosis en 19 países (Herrera et al., 2020a) y se ha confirmado la circulación de 12 de las 20 especies de *Leishmania*, consideradas agentes etiológicos de leishmaniosis humanas; sin embargo, otras especies han sido objeto de discusiones o revisiones taxonómicas (Cupolillo, 2020).

En Bolivia, las leishmaniosis son un problema de salud que afectan a siete de los nueve departamentos (Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia, 2015b). La migración de la población de las zonas no endémicas hacia zonas endémicas, en busca de mejores condiciones de vida, constituye uno de los factores predisponentes a contraer la enfermedad. Los nuevos asentamientos humanos y las nuevas zonas agrícolas, donde el ciclo de la enfermedad es silvestre (Maia-Elkhoury et al., 2021; Mollinedo et al., 2020a), hacen que el comportamiento de la enfermedad cambie de un ciclo silvestre inicial, hacia un ciclo peri-doméstico y doméstico (Ballart et al., 2016), generando nuevos focos de LT e incremento del número de casos (Mollinedo & Mollinedo, 2020b). Las especies citadas en Bolivia son: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. lainsoni*, del subgénero *Viannia*, y *L. amazonensis* y *L. infantum* (causante fundamentalmente de LV y leishmaniosis canina), del subgénero *Leishmania* (Cupolillo, 2020; Herrera et al., 2020b).

Existen numerosos métodos para la identificación de especies de *Leishmania*, bioquímicos, moleculares y proteómicos (espectroscopia de masas) (Akhoundi et al., 2017, 2016). En la década de los noventa, el método bioquímico de análisis electroforético de las isoenzimas (MLEE), fue el más utilizado en la identificación de especies de *Leishmania* (Akhoundi et al., 2016), siendo sus principales limitaciones técnicas, la necesidad de aislar los parásitos mediante cultivo y por ser actualmente utilizada en muy pocos centros como herramienta de tipificación de especies de *Leishmaniasis* (Akhoundi et al., 2016; Cupolillo, 2020). Esta técnica, ha sido considerada durante mucho tiempo el estándar de referencia de identificación (OMS, 2010; Van der Auwera & Dujardin, 2015) y también ha servido como técnica de referencia para la evaluación de técnicas de

identificación (Fernández-Arévalo et al., 2022; Lachaud et al., 2017; Van der Auwera et al., 2014; Zemanová et al., 2007). En la actualidad, la caracterización se realiza principalmente por análisis molecular, sin existir consenso sobre cuál es el método o marcador más adecuado (OMS, 2010; Schonian et al., 2011). En Bolivia la caracterización de especies de *Leishmaniosis*, se realiza en forma esporádica solo con fines epidemiológicos o de investigación y la técnica utilizada ha sido la PCR-RFLP (García et al., 2009). Esta técnica permite la identificación de las especies de *Leishmania* de importancia médica, tanto del VM como del NM, sobre la base de una única PCR, por lo que es posible implementarla en lugares donde se dispone de PCR (Montalvo et al., 2010). Además, en los últimos años, la técnica utilizada en Bolivia por García (García et al., 2009), se ha basado en el análisis del gen de la proteína de choque térmico 70 (*hsp70*), mediante la PCR seguida por RFLP, que ha sido muy utilizada en las Américas para la caracterización de especies neotropicales (Cupolillo, 2020).

En nuestro caso, y dados los resultados obtenidos por diversos autores (Fernández-Arévalo et al., 2022; Van der auwera et al., 2013), escogimos como técnica de referencia la secuenciación del gen *hsp70*, que ha sido utilizada en los artículos 1 y 2 de resultados.

En los últimos años, a partir de 2014, la técnica de MALDI TOF-MS, ha incursionado en la identificación de especies de *Leishmania*, dando resultados alentadores (Cassagne et al., 2014; Culha et al., 2014; Mouri et al., 2014). Esta técnica ha sido evaluada en el segundo de los artículos que conforman los resultados de la memoria de tesis doctoral.

En el primer artículo, titulado “**Tegumentary leishmaniosis by *Leishmania braziliensis* complex in Cochabamba, Bolivia including the presence of *L. braziliensis* outlier**”, se pretendía ahondar en el estudio del complejo *L. braziliensis* en Bolivia. Esta especie causa LT en la mayoría de países de América (Argentina, Belice, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Suriname y Venezuela) (OPS, 2020), y según reportes existentes, el 93% de casos de LT en Bolivia están causados por *L. braziliensis*.

Varios estudios sobre *L. braziliensis* en Latinoamérica habían mostrado la diversidad genética del complejo (Baptista et al., 2012; Odiwuor et al., 2012; Ramírez et al., 2016), pero tan sólo un estudio incluía tres cepas de referencia de Bolivia (Odiwuor et al., 2012). Nuestro estudio ha permitido detectar la presencia de dos especies de *Leishmania* del complejo en Bolivia, *L. braziliensis* “sensu stricto” y *L. peruviana* y una posible especie, *L. braziliensis* outlier, que presentan una elevada

diversidad genética al analizar los resultados obtenidos por secuenciación del fragmento de 1245 pb del gen *hsp70*. También se han caracterizado posibles híbridos de *L. braziliensis*/*L. peruviana*. *L. braziliensis* outlier ha sido aislada en Perú, Panamá y también en Bolivia (Fraga et al., 2013; Odiwuor et al., 2012; Van der auwera et al., 2013). Esta *Leishmania*, ha presentado una mayor diversidad genética (9 genotipos diferentes en 16 cepas analizadas) en relación a *L. braziliensis* (6 genotipos en 24 cepas) y *L. peruviana* (1 genotipo en 1 cepa), característica que la posiciona a mayor distancia genética de *L. braziliensis* y *L. peruviana*, y próxima a cepas de referencia de *L. lainsoni*. Sin embargo, pese a la facilidad de su discriminación genética en comparación a *L. braziliensis* “sensu stricto” y *L. peruviana*, aún no existe un consenso en su denominación ni en su posición taxonómica (Van der Auwera & Dujardin, 2015).

Es la primera vez que se reporta *L. peruviana* en Bolivia, cuya presencia se limitaba, inicialmente, a las zonas endémicas andinas del Perú (Dujardin et al., 1995)

Hasta la fecha, *L. braziliensis* “sensu stricto” es considerada como la especie más frecuentemente aislada de LM, pero otras especies que pueden afectar las mucosas en el NM son *L. panamensis*, principalmente, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* y *L. mexicana* (Abadías-Granado et al., 2021; Gomez et al., 2020; Llanos-Cuentas, 2020). También se han descrito casos ocasionales por *L. peruviana* e híbridos de *L. braziliensis*/*L. peruviana* (Llanos-Cuentas, 2020). En Bolivia, la afectación de los pacientes abarca a un 20% de la población, fundamentalmente a varones y a personas entre 16-40 años sobre todo en el Chapare del departamento de Cochabamba seguido de La Paz, Santa Cruz, Beni y Pando (David et al., 1993).

En nuestro estudio, las tres especies del complejo *L. braziliensis* han sido aisladas de casos de LM, siendo *L. braziliensis* la que ha dado lugar principalmente a esta manifestación clínica (80% de los casos de LM), aunque ha sido aislada más frecuentemente de pacientes con lesiones cutáneas (58%). Es importante mencionar que un 5% de la población infectada por *L. braziliensis*, tiene riesgo de desarrollar LM después de semanas e incluso hasta más de 20 años después de haber cursado una LC, produciéndose en la etapa final obstrucción y destrucción de la nariz, faringe y laringe y muerte por infecciones bacterianas secundarias, si no es tratada a tiempo (Dawit et al., 2013; OMS, 2010).

L. braziliensis grupo atípico ha sido aislado con mayor frecuencia de pacientes lesiones cutáneas (92%) y solo de un paciente con lesión mucosa, quien presentó además falla terapéutica. En

estudios previos *L. braziliensis* atípica había sido reportado exclusivamente de aislados provenientes de lesiones cutáneas (Odiwuor et al., 2012; Van der Auwera et al., 2013).

En lo que respecta a *L. peruviana*, el único aislado de esta especie procedía de un paciente con lesión mucosa proveniente de la provincia del Chapare del departamento de Cochabamba y que presentaba, a su vez, falla terapéutica al tratamiento con Glucantime® y a Anfotericina B.

La presencia de las posibles cepas híbridas *L. braziliensis/L. peruviana* en nuestro estudio, aisladas también en Perú (Kato et al., 2019, 2016; Nolder et al., 2007; Odiwuor et al., 2012), podría ser una evidencia de la evolución genética de *L. braziliensis* hasta llegar a adquirir el perfil genético de *L. peruviana*, puesto que está establecido que *L. braziliensis* es antecesora de *L. peruviana*, producto de la adaptación a los diferentes ecosistemas del Perú (Dujardin et al., 1995) Una de las dos cepas híbridas aisladas procedía de un paciente con LM y ninguna de las dos cepas respondió al tratamiento con antimoniales.

Basados en las ventajas del MALDI-TOF MS en la identificación de las leishmanias como son su rapidez, bajo coste y facilidad de manejo, una vez obtenidos los cultivos (Clark et al., 2013; Croxatto et al., 2012), se pensó que esta técnica podría ser una alternativa de caracterización de especies de *Leishmania* en áreas endémicas de países en vías de desarrollo como Bolivia. El artículo, titulado **“Usefulness of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in the Characterization of *Leishmania* Strains Causing Tegumentary Leishmaniosis in Bolivia versus *hsp70* Gene Sequencing”**, consistió en la evaluación de la técnica de MALDI TOF-MS en la caracterización de especies de *Leishmania* causantes de LT en Bolivia, utilizando como técnica de referencia la secuenciación del gen *hsp70*. En este estudio, se analizaron 55 cepas aisladas de 44 pacientes con LT en Bolivia durante los años 2004 – 2015. El MALDI-TOF MS fue comparado con la secuenciación del fragmento de 1245 pb del gen *hsp70*, técnica usada como referencia. Mediante la secuenciación se identificaron en el subgénero *Viannia*: *L. braziliensis* “sensu stricto”, *L. braziliensis* outlier, *L. peruviana*, *L. lainsoni*, *L. guyanensis* y posibles híbridos de *L. braziliensis/L.peruviana*, y en el subgénero *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. mexicana* y posibles híbridos de *L. amazonensis/L. mexicana*. En base a estos resultados el MALDI-TOF MS identificó correctamente el 81,8% del total de las cepas de *Leishmania* analizadas, pudiendo alcanzar hasta el 93,5% de correcta identificación, cuando se excluyeron a las cepas híbridas. Estos resultados son similares a los obtenidos en otras

investigaciones, donde se utilizaron diferentes especies de *Leishmania*, tanto del del VM como del NM (Cassagne et al., 2014; Fernández-Arévalo et al., 2022; Mouri et al., 2014). La técnica de MALDI-TOF MS, fue capaz de identificar en forma correcta cepas de *Leishmania*, a nivel de género, subgénero y complejo. Sin embargo, a nivel de especies, solo fueron correctamente identificadas las especies que se encuentran a mayor distancia genética (Neighbor-Net): *L. lainsoni*, *L. guyanensis* y dentro del complejo *L. braziliensis* a *L. braziliensis* outlier que fue claramente diferenciada de *L. braziliensis* “sensu stricto”, aunque esta posible subespecie, no tiene una clasificación taxonómica definida (Odiwuor et al., 2012). *L. peruviana* por su parte, por su gran similitud genética con *L. braziliensis* “sensu stricto” (Van der Auwera & Dujardin, 2015), ha sido identificada por MALDI-TOF MS como *L. braziliensis* lo que concuerda con otros estudios realizados (Cassagne et al., 2014; Lachaud et al., 2017). Dentro del subgénero *Leishmania*, hubo mayor problema de identificación a nivel de especie, ya que el MALDI-TOF MS, solo identificó a la cepa de *L. amazonensis* en forma correcta y, en cambio, las cepas de *L. mexicana* fueron identificadas erróneamente como *L. amazonensis*, resultados que posiblemente se deban a la variabilidad genética y geográfica entre los miembros de este complejo (Van der Auwera & Dujardin, 2015).

Una de las limitaciones de la técnica de MALDI-TOF MS, en la identificación de especies de *Leishmania*, es la falta de discriminación de cepas híbridas, que en el caso de las cepas *L. braziliensis/L. peruviana*, puede ser debido a la variabilidad de la secuencia del gen *hsp70*, por lo que fueron identificadas simplemente como *L. braziliensis*. Otras cepas híbridas de este complejo, ya habían sido previamente estudiadas, y se sabe que están circulando en ciertas áreas endémicas de LT incluyendo Bolivia (Dujardin et al., 1995; Nolder et al., 2007). En el caso de híbridos del complejo *L. mexicana* del NM, la falta de discriminación podría estar relacionada a la presencia de 3 a 4 sitios polimórficos en la secuencia nucleotídica del gen *hsp70* (datos no mostrados). Si bien este complejo ya ha sido estudiado previamente, no hemos encontrado datos reportados sobre híbridos. Ante este hecho, la presencia de cepas híbridas en zonas endémicas de LT, conllevaría a la identificación errónea por MALDI-TOF MS, pero dentro del mismo complejo.

Teniendo en consideración la gran variabilidad genética que presentan las especies de *Leishmania* del NM (Cupolillo et al., 1998), será necesario fortalecer aún más, y en número similar, el banco de espectros existentes en el MSL incluyendo más especies e híbridos de cepas de *Leishmania* de diferentes hospedadores y regiones geográficas, dado a que una de las limitantes de este sistema

es la dependencia de la calidad y precisión de la base de datos existente (Ballesté, 2018). De hecho, en una primera aproximación, no se identificaban correctamente las *L. braziliensis* outlier, pero al incluir más cepas en el banco de espectros los resultados, se solucionó este problema. Otra limitante del MALDI-TOF MS, es que requiere parásitos en cultivo, porque la precisión de los espectros está relacionado con la concentración de parásitos (Liébana-Martos, 2018). Sin embargo, en comparación con las técnicas moleculares, ésta ofrece grandes ventajas, como la rapidez en la obtención de resultados, la simplicidad, el costo para la identificación de aislamientos y facilidad para integrarse en un laboratorio clínico (Clark et al., 2013; Mouri et al., 2014), ya que el equipo, una vez instalado, podría ser aprovechado para su uso en la identificación de otros microorganismos que causan problemas de salud en países en vías de desarrollo, donde las herramientas moleculares aún no son rutinariamente utilizadas con fines de diagnóstico y de caracterización, por su elevado costo y requerir personal capacitado (Lachaud et al., 2017; Singhal et al., 2015). La identificación de especies de *Leishmania*, permitiría al paciente recibir un tratamiento específico y oportuno, mejorar su manejo y contribuir en el diseño de estrategias de control de la LT en nuestro país.

El tratamiento de la LT en Bolivia, es subvencionado y aplicado bajo supervisión médica, debido a su toxicidad, que a veces es necesario la suspensión del tratamiento (Dedet et al., 1995). Por este motivo, es un requisito indispensable la confirmación de diagnóstico clínico mediante el diagnóstico de laboratorio.

El diagnóstico de la LT en el país, se realiza rutinariamente por EPD mientras que el cultivo axénico es realizado únicamente en laboratorios especializados con infraestructura adecuada y personal capacitado (De Vries et al., 2015). Basados en este hecho, en el tercer capítulo de resultados evaluamos cuatro técnicas parasitológicas de diagnóstico utilizando dos métodos de toma de muestras. Los resultados de esta investigación se encuentran descritos en el manuscrito **“The need for integrate culture technique for tegumentary leishmaniosis diagnosis in Bolivia: A comparative evaluation of four parasitological techniques using two sampling methods”**. Las técnicas de diagnóstico parasitológico evaluadas fueron el EPD y tres métodos de cultivo (cultivo en medio TSTB, MNC y MCC, estos dos últimos en medio de cultivo Schneider suplementado con 20% de FBS). Para cada uno de los métodos se utilizaron dos tipos de muestras (aspirado y raspado, ambos de los bordes de las lesiones). Según la OPS/OMS, se pueden utilizar tres tipos de muestras en el diagnóstico de LT, muestras obtenidas por aspiración, raspado o trozos

de biopsia (OPS/OMS, 2019). Una muestra idónea para el diagnóstico de la LT, debe ser de bajo costo, poco traumática y segura, y su elección dependerá de las características clínicas de las lesiones. La toma de muestra de piezas de biopsia, por ser traumática e invasiva, solo debe realizarse para descartar otras enfermedades (Aronson & Joya, 2019). La calidad de una muestra para diagnóstico de LT, dependerá de la experiencia del personal de laboratorio y repercutirá en la calidad de los resultados de diagnóstico obtenido. Por otro lado, la elección de la técnica de diagnóstico, dependerá de la infraestructura y los recursos disponibles en el establecimiento de salud y no tanto de la precisión diagnóstica de la técnica (De Vries et al., 2015). Por este motivo es necesario optimizar las herramientas diagnósticas disponibles, a fin de obtener un diagnóstico preciso y temprano, y poder realizar el tratamiento y seguimiento adecuados de las personas afectadas (OPS/OMS, 2017). Un resultado falso positivo llevará a someter al paciente a un tratamiento altamente tóxico, sin necesidad de requerirlo, y quitar la oportunidad de tratamiento a otro paciente que si lo requiera, dada la disponibilidad intermitente de medicamentos por ser subvencionado, y que en su desesperación de curar su lesión, acude a las farmacias privadas a tratar de conseguir el medicamento, donde hay una escasa disponibilidad para su expendio por su elevado costo (insuficiente para realizar un tratamiento completo) (Peláez-Sánchez, 2012). Ello fuerza a realizar tratamientos incompletos y a generar posibles fallas terapéuticas, que ya están reportadas en ciertos países y en Bolivia (Llanos-Cuentas et al., 2008; Rojas et al., 2021; Vélez & Carrillo, 2013) y, posiblemente, a largo plazo podría generar el genotipo de resistencia de *Leishmania* a los medicamentos disponibles en Bolivia, como sucede en la India (Ponte-Sucre et al., 2017). Por otra parte, un resultado falso negativo, quitaría la oportunidad al paciente de realizar un tratamiento rápido y oportuno, y favorecería la evolución de una LC a una LM, teniendo en consideración que el 90% de las lesiones en la LT, son causadas por *L. braziliensis* (García et al., 2007a) y que aproximadamente el 20% de éstas pueden evolucionar a una lesión mucosa si no se realiza el tratamiento oportuno (García et al., 2009).

Según los resultados obtenidos en la presente investigación el EPDS, presentó una sensibilidad del 45%, superior al EPDA. Los reportes científicos muestran que el EPD presenta una sensibilidad variable entre el 27,9 al 85% (Boggild et al., 2007, 2008, 2010; Cantanhêde et al., 2021; De Almeida et al., 2021; De Mello et al., 2011; Marco et al., 2012; J. Ramírez et al., 2002; Weigle et al., 1987). Es difícil comparar los resultados de la EPD de los diferentes estudios, debido a la diversidad de utensilios utilizados para la toma de muestras (lanceta, bisturí, palillo, sacabocados,

cepillos de citología, aguja, aguja fina), sitios de muestreo de la lesión (bordes indurado o centro), lesión reciente o más antigua, métodos de toma de muestras (aspiración, raspado o biopsia) y por requerir personal capacitado.

La normativa nacional de Leishmaniosis de Bolivia, menciona que el cultivo para el diagnóstico de LT puede ser implementado desde laboratorios de segundo nivel ([Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015a](#))(Ministerio de salud del Estado Plurinacional de Bolivia., 2015). Sin embargo, en la actualidad el cultivo es utilizado en forma rutinaria en tres laboratorios de referencia de Bolivia, INLASA (La Paz), CENETROP (Santa Cruz) y LABIMED (Cochabamba) y de forma eventual en dos laboratorios de hospitales de segundo nivel de la región tropical de Cochabamba. En la presente investigación la técnica TSTBS presentó una sensibilidad del 98% con un índice de concordancia del 88% y un coeficiente de fiabilidad catalogado como satisfactorio (94%). Los resultados muestran la utilidad de la muestra de raspado para realizar las técnicas de cultivo, puesto que todas las técnicas evaluadas con los cultivos presentaron mayor sensibilidad que con la muestra de aspirado. Un problema del raspado es que puede dar lugar a un mayor grado de contaminación, como se ha mostrado en nuestro estudio. Sin embargo, ello no afectó la sensibilidad de las mismas, a diferencia de otras investigaciones realizadas ([Aronson & Joya, 2019](#); [Montealegre, 2010](#)). posiblemente la contaminación en el presente estudio estuvo relacionada con el retardo del crecimiento de los parásitos, puesto que a los siete días de incubación el 93% de los cultivos en TSTBA fueron positivos, mientras que TSTBS solo 83%, pero a los 14 días de incubación el 98% de los cultivos fueron positivos tanto TSTBA como en TSTBS. Una medida para evitar estas contaminaciones es el tratamiento previo a que deberían someterse los pacientes antes de la toma de muestras, procediendo a un buen lavado de las lesiones, tal y como se pidió en el presente estudio.

Los resultados de nuestra investigación muestran que el raspado de los bordes de la lesión fue más útil que la aspiración para el diagnóstico de LT, ya sea para la EDP o para el cultivo. El EPD puede seguir utilizándose en el diagnóstico de LT por las ventajas que presenta, sobre todo la seguridad para el personal de laboratorio. Pero por los resultados obtenidos, es necesario instar a las autoridades para que se implemente el cultivo en TSTB en el diagnóstico de la LT, ya que se ha duplicado el número de casos inicialmente diagnosticados por el EPD. Sin embargo, para ello es necesario capacitar al personal de los laboratorios de segundo y tercer nivel en Bolivia.

V. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS/CONCLUSIONS

V. CONCLUSIONES

A) Estudio sistematizado del rendimiento de la secuenciación del gen *hsp70* de aislados de *Leishmania* causantes de leishmaniosis tegumentaria en Bolivia con especial hincapié en el estudio del complejo *Leishmania braziliensis* y su relación con las características clínicas

1. La secuenciación del fragmento de 1245 pb del gen *hsp70* ha sido útil en la caracterización de 55 cepas de *Leishmania* aisladas en Bolivia en el periodo comprendido entre 2004-2015, permitiendo la caracterización de 23 cepas de *Leishmania braziliensis sensu stricto*, 18 cepas de *Leishmania braziliensis* outlier, una cepa de *Leishmania peruviana*, dos cepas de *Leishmania lainsoni*, una cepa de *Leishmania guyanensis*, dos cepas de *Leishmania mexicana*, una cepa de *Leishmania amazonensis*, dos posibles cepas híbridas de *Leishmania braziliensis/Leishmania peruviana* y 5 posibles cepas híbridas de *Leishmania mexicana/Leishmania amazonensis*.
2. Se ha evidenciado el polimorfismo genético del gen *hsp70* en las leishmanias del complejo *Leishmania braziliensis*, obteniéndose 16 genotipos diferentes: seis genotipos de *Leishmania braziliensis sensu stricto*, nueve genotipos de *Leishmania braziliensis* outlier y un genotipo de *L. peruviana*.
3. El análisis genético del complejo *Leishmania braziliensis* permite observar que *Leishmania braziliensis* outlier, se encuentra claramente separada genéticamente de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania peruviana* mientras que los posibles híbridos de *Leishmania braziliensis/Leishmania peruviana* se ubican entre las ramas de ambas especies.
4. Se ha identificado *Leishmania braziliensis sensu stricto* en 19 pacientes, once presentaban lesiones cutáneas y ocho lesiones mucosas. Cuatro de los pacientes con lesiones cutáneas y dos con lesiones mucosas presentaron falla terapéutica.
5. *Leishmania peruviana* ha sido aislada, por primera vez en Bolivia, de un paciente afectado de leishmaniosis mucosa que presentaba falla terapéutica.
6. *Leishmania braziliensis* outlier, ha sido aislada casi exclusivamente de lesiones cutáneas, a excepción de una cepa aislada de lesión de la mucosa, y ninguno de los pacientes infectados con esta especie presentó falla terapéutica.

B) Evaluación de la utilidad del MALDI-TOF MS en la caracterización de las especies de *Leishmania* causantes de leishmaniosis tegumentaria en Bolivia

1. La técnica de MALDI-TOF MS discrimina, de forma correcta, cepas bolivianas de *Leishmania* a nivel de género, subgénero y complejo.
2. La técnica de MALDI TOF-MS, caracterizó correctamente el 82% de las cepas a nivel de especie, incluyendo la totalidad de cepas de *Leishmania braziliensis* (23), *Leishmania braziliensis* outlier (18), *Leishmania lainsoni* (2), *Leishmania guyanensis* (1) y *Leishmania amazonensis* (1). Sin embargo, ha fallado en la identificado de *Leishmania peruviana* (1) y *Leishmania mexicana* (2).
3. La técnica de MALDI-TOF MS no permite identificar híbridos potenciales de *Leishmania*, mientras que el análisis del polimorfismo del gen *hsp70* puede detectar las características genéticas de ambas especies.
4. MALDI TOF-MS presenta las ventajas de su rapidez en la obtención de resultados, su simplicidad, el menor coste para la identificación de aislamientos de *Leishmania*, una vez obtenido el cultivo, y su facilidad de integrarse a un laboratorio clínico, por lo que podría constituirse como una estrategia de caracterización de especies de *Leishmania* en países endémicos donde aún no se tienen implementada la caracterización molecular.

C) Evaluación de la muestra biológica y el diagnóstico parasitológico en el diagnóstico de la leishmaniosis tegumentaria en Bolivia

1. La leishmaniosis tegumentaria fue confirmada en 96 pacientes (82%) por al menos una técnica parasitológica y un método de muestreo, considerado como el patrón de referencia.
2. La muestra de raspado tuvo mayor rendimiento (81%) que la de aspirado (78%), siendo así en las cuatro técnicas de diagnóstico evaluadas (examen parasitológico directo, cultivos en TSTB, MNC y MCC en medio Schneider), lo que le confiere una mayor idoneidad, juntamente con el hecho de ser menos traumática para el paciente y más segura para el personal de laboratorio.
3. La técnica de diagnóstico utilizada que presentó la mayor sensibilidad (94%) fue el cultivo en TSTB, independientemente de la toma de muestra realizada.

4. El porcentaje de positividad en los cultivos positivos aumenta con el tiempo de cultivo, independientemente del método utilizado, pasando del 84% en el día 7 al 100% en el día 28, lo que sugiere que los cultivos deben mantenerse durante este tiempo.
5. Se observó contaminación bacteriana, por levaduras y hongos filamentosos en un 18,32% de los cultivos, independientemente del método de muestreo y de cultivo, siendo la más frecuente la bacteriana (9,5% de los cultivos contaminados). A pesar de ello, se observó crecimiento de las leishmanias en un 17% de los medios contaminados.
6. El minicultivo en medio de Schneider presenta el porcentaje más elevado de contaminación, aproximadamente del 33%.
7. El diagnóstico por cultivo debería ser implementado en Bolivia, por lo que se recomienda capacitar al personal de los laboratorios de segundo y tercer nivel. Cuando no sea posible, la muestra obtenida *in situ* podría ser enviada, en condiciones adecuadas, a un laboratorio cercano equipado para realizar el cultivo.

V. CONCLUSIONS

A) Systematized study of the performance of the *hsp70* gene sequencing of *Leishmania* isolates causing tegumentary leishmaniasis in Bolivia with special emphasis on the study of the *Leishmania braziliensis* complex and its relationship with clinical characteristics

1. The sequencing of the 1245 bp fragment of the *hsp70* gene proved to be useful in the characterization of 55 strains of *Leishmania* isolated in Bolivia in 2004-2015, allowing the characterization of 23 strains of *Leishmania braziliensis sensu stricto*, 18 strains of *Leishmania braziliensis* outlier, one strain of *Leishmania peruviana*, two strains of *Leishmania lainsoni*, one strain of *Leishmania guyanensis*, two strains of *Leishmania mexicana*, one strain of *Leishmania amazonensis*, two possible hybrid strains of *Leishmania braziliensis/Leishmania peruviana* and five possible hybrid strains of *Leishmania mexicana/Leishmania amazonensis*.
2. Genetic polymorphism of the *hsp70* gene has been demonstrated in species of the *Leishmania braziliensis* complex, with the identification of 16 different genotypes: six genotypes of

Leishmania braziliensis sensu stricto, nine genotypes of *Leishmania braziliensis* outlier and one genotype of *L. peruviana*.

3. The genetic analysis of the *Leishmania braziliensis* complex allows us to observe that *Leishmania braziliensis* outlier is clearly genetically separated from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania peruviana* while the possible hybrids of *Leishmania braziliensis/Leishmania peruviana* are located between the branches of both species.
4. *Leishmania braziliensis sensu stricto* was identified in 19 patients, eleven with skin lesions and eight with mucosal lesions. Four of the patients with cutaneous lesions and two with mucosal lesions experienced therapeutic failure.
5. *Leishmania peruviana* has been isolated, for the first time in Bolivia, from a patient affected by mucosal leishmaniasis with therapeutic failure.
6. *Leishmania braziliensis* outlier was isolated almost exclusively from skin lesions, except for one strain isolated from mucosal lesions, and none of the patients infected with this species experienced therapeutic failure.

B) Evaluation of the usefulness of MALDI-TOF MS in the characterization of *Leishmania* species causing tegumentary leishmaniasis in Bolivia

1. The MALDI-TOF MS technique correctly discriminate Bolivian *Leishmania* strains at the genus, subgenus, and complex level.
2. The MALDI TOF-MS technique correctly characterized 82% of the strains at species level, including the totality of *Leishmania braziliensis* (23), *Leishmania. braziliensis* outlier (18), *Leishmania lainsoni* (2), *Leishmania guyanensis* (1) and *Leishmania amazonensis* (1). However, it failed to identify *Leishmania peruviana* (1) and *Leishmania mexicana* (2).
3. The MALDI-TOF MS technique cannot identify potential *Leishmania* hybrids, whereas analysis of *hsp70* gene polymorphism can detect genetic characteristics of both species.
4. MALDI TOF-MS has the advantages of providing rapid results, simplicity, lower cost for the identification of *Leishmania* isolates once the culture is obtained, and ease of integration in a clinical laboratory. The technique could therefore be suitable for the characterization of

Leishmania species in endemic countries where molecular techniques have not yet been implemented.

C) Evaluation of biological samples and parasitological techniques in the diagnosis of tegumentary leishmaniasis in Bolivia

1. Tegumentary leishmaniasis was confirmed in 96 patients (82%) by at least one parasitological technique and one sampling method, considered as the reference standard.
2. Scraping samples had a higher yield (81%) than aspirate samples (78%) in the four diagnostic techniques evaluated (direct parasitological examination, and culture in TSTB, MNC and MCC in Schneider's medium), indicating higher effectivity. Additionally, they are less traumatic for the patient and safer for laboratory personnel.
3. The diagnostic technique used that presented the highest sensitivity (94%) was the TSTB culture, regardless of the sample taken.
4. The percentage of positivity in positive cultures increased with culture time, regardless of the method used going from 84% at day 7 to 100% at day 28.
5. Bacterial, yeast and filamentous fungal contamination was observed in 18.32% of the cultures, regardless of the sampling and culture method, with bacterial contamination being the most frequent (9.5% of contaminated cultures). Nevertheless, leishmanias growth was observed in 17% of the contaminated media.
6. The miniculture in Schneider's medium had the highest percentage of contamination (approximately 33%).
7. Diagnosis by culture should be implemented in Bolivia, and second and third level laboratory personnel should be trained accordingly. When this is not possible, the sample obtained *in situ* could be sent, under suitable conditions, to a nearby laboratory equipped to perform the culture.

V. CONCLUSIONS

A) Etude systématique de la performance du séquençage du gène *hsp70* d'isolats de *Leishmania* responsables de la leishmaniose tégumentaire en Bolivie avec un attention particulier sur l'étude du complexe *Leishmania braziliensis* et sa relation avec les caractéristiques cliniques

1. Le séquençage du fragment de 1245 pb du gène *hsp70* a été utile dans la caractérisation de 55 souches du complexe *Leishmania braziliensis* isolées en Bolivie dans la période entre 2004 et 2015, permettant la caractérisation de 23 souches de *Leishmania braziliensis sensu stricto*, 18 souches atypiques de *Leishmania braziliensis*, une souche de *Leishmania peruviana*, deux souches de *Leishmania lainsoni*, une souche de *Leishmania guyanensis*, deux souches de *Leishmania mexicana*, une souche de *Leishmania amazonensis*, deux souches possibles hybrides de *Leishmania braziliensis/Leishmania peruviana* et cinq souches possibles hybrides de *Leishmania mexicana/Leishmania amazonensis*.
2. Le polymorphisme génétique du gène *hsp70* a été démontré chez les leishmanies du complexe *Leishmania braziliensis*, obtenant 16 génotypes différents : six génotypes de *Leishmania braziliensis sensu stricto*, neuf génotypes de *Leishmania braziliensis* atypiques et un génotype de *Leishmania peruviana*.
3. L'analyse génétique du complexe *Leishmania braziliensis* permet de constater que les souches atypiques de *Leishmania braziliensis* sont clairement séparées génétiquement de *Leishmania braziliensis* et de *Leishmania peruviana* tandis que les hybrides possibles de *Leishmania braziliensis/Leishmania peruviana* sont situés entre les branches des deux espèces.
4. *Leishmania braziliensis sensu stricto* a été identifiée chez 19 patients, onze présentaient des lésions cutanées et huit des lésions muqueuses. Quatre patients avec lésions cutanées et deux patients avec lésions muqueuses ont présenté un échec thérapeutique.
5. *Leishmania peruviana* a été isolée, pour la première fois en Bolivie, chez un patient atteint de leishmaniose muqueuse qui présentait un échec thérapeutique.

6. *Leishmania braziliensis* atypique a été isolé presque exclusivement à partir de lésions cutanées, à l'exception d'une souche isolée de lésions muqueuses, et aucun des patients infectés avec cette espèce n'a présenté d'échec thérapeutique.

B) Évaluation de l'utilité du MALDI-TOF MS dans la caractérisation des espèces de *Leishmania* responsables de la leishmaniose tégumentaire en Bolivie

1. La technique MALDI-TOF MS est capable de discriminer correctement les souches boliviennes de *Leishmania* au niveau du genre, du sous-genre et du complexe.
2. La technique MALDI TOF-MS a correctement caractérisé 82% des souches à niveau d'espèce, y compris toutes les souches de *Leishmania braziliensis* (23), *Leishmania. braziliensis* atypique (18), *Leishmania lainsoni* (2), *Leishmania guyanensis* (1) et *Leishmania amazonensis* (1). Cependant, elle n'a pas réussi à identifier *Leishmania peruviana* (1) et *Leishmania mexicana* (2).
3. La technique MALDI-TOF MS ne peut pas identifier les hybrides potentiels de *Leishmania*, tandis que l'analyse du polymorphisme du gène *hsp70* peut détecter les caractéristiques génétiques des deux espèces.
4. MALDI TOF-MS présente les avantages de sa rapidité d'obtention des résultats, de sa simplicité, du moindre coût pour l'identification des isolats de *Leishmania*, une fois la culture obtenue, et de sa facilité d'intégration dans un laboratoire clinique, donc qui pourrait être constitué comme stratégie de caractérisation des espèces de *Leishmania* dans les pays endémiques où la caractérisation moléculaire n'a pas encore été mise en œuvre.

C) Évaluation de l'échantillon biologique et du diagnostic parasitologique dans le diagnostic de la leishmaniose tégumentaire en Bolivie

1. La leishmaniose tégumentaire a été confirmée chez 96 patients (82%) par au moins une technique parasitologique et une méthode de prélèvement, considérées comme standard de référence.

-
2. L'échantillon gratté a eu un rendement plus élevé (81%) que l'échantillon aspiré (78%), ceci étant le cas dans les quatre techniques de diagnostic évaluées (examen parasitologique direct, cultures en TSTB, MNC et MCC en milieu Schneider), ce qui lui confère une plus grande aptitude, outre le fait qu'il est moins traumatisant pour le patient et plus sûr pour le personnel du laboratoire.
 3. La technique de diagnostic utilisée qui présentait la sensibilité la plus élevée (94%) était la culture TSTB, quel que soit l'échantillon prélevé.
 4. Le pourcentage de positivité dans les cultures positives augmente avec la durée de la culture, quelle que soit la méthode utilisée passant du 84% au jour 7 à 100% au jour 28, ce qui suggère que les cultures doivent être maintenues pendant cette période.
 5. Des contaminations bactériennes, levures et champignons filamenteux ont été observées dans 18,32 % des cultures, quelle que soit la méthode d'échantillonnage et de culture, la contamination bactérienne étant la plus fréquente (9,5 % des cultures contaminées). Malgré cela, une croissance des leishmanies a été observée dans 17 % des milieux contaminés.
 6. La mini-culture du milieu de Schneider présente le pourcentage de contamination le plus élevé, environ 33%.
 7. Le diagnostic par culture devrait être mis en œuvre en Bolivie, il est donc recommandé de former le personnel des laboratoires de deuxième et troisième niveaux. Lorsque cela n'est pas possible, l'échantillon obtenu "in situ" pourrait être envoyé, dans des conditions adaptées, à un laboratoire proche équipé pour réaliser la culture.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 112(7), 601–618. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>
- Adaui, V., Lye, L. F., Akopyants, N. S., Zimic, M., Llanos-Cuentas, A., Garcia, L., Maes, I., De Doncker, S., Dobson, D.E., Arevalo, J., Dujardin, J.C., Beverley, S. M. (2016). Association of the endobiont double-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *Journal of Infectious Diseases*, 213(1), 112–121. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv354>
- Akhavan, A. A., Mirhendi, H., Khamesipour, A., Alimohammadian, M. H., Rassi, Y., Bates, P., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Arandian, M.H., Abdoli, H., Jalali-zand, N., Jafari, R., Shareghi, N., Ghanei, M., Yaghoobi-Ershadi, M.R. (2010). *Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Experimental Parasitology*, 126(4), 552–556. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.003>
- 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(2017), 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 Negl Trop Dis*, 10(3), 1–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Alcáis, A., Abel, L., David, C., Torrez, M. E., Flandre, P., & Dedet, J. P. (1997). Risk factors for onset of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57(1), 79–84. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.79>
- Allahverdiyev, A., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M., & Memisoglu, H. (2004). A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *American Journal of*

- Tropical Medicine and Hygiene, 70(3), 294–297.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.294>
- Alvar, J., Yactayo, S., & Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. Trends in Parasitology, 22(12), 552–557. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>
- Andrade-Narvaez, F. J., Medina-Peralta, S., Vargas-Gonzalez, A., Canto-Lara, S. B., & Estrada-Parra, S. (2005). The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan Peninsula, Mexico. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 47(4), 191–194. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000400003>
- Aramayo, L., Copa, G., Hoyos, C., Almazán, M., Juarez, M., Cajal, S. P., Krolewiecki, A.J., Nasser, J. R. (2022). Leishmaniasis tegumentaria y flebótomos en la localidad de Colonia Santa Rosa del norte de Argentina Lorena. Revista Argentina de Microbiología, 54, 143–151. <https://doi.org/DOI: 10.1016/j.ram.2021.06.002>
- Arana, M., Evans, D., Zolessi, A., Llanos Cuentas, A., & Arevalo, J. (1990). Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 84, 526–529. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90025-A](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90025-A)
- Araujo Carreira, J. C., Figueiredo Mafra Magalhes, M. de A., & Machado Da Silva, A. V. (2014). The Geospatial Approach on Eco-Epidemiological Studies of Leishmaniasis. In D. M. Claborn (Ed.), Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment (pp. 126–145). <https://doi.org/10.5772/57210>
- Arevalo, J., Ramirez, L., Adai, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., De Doncker, S., Maurer, A., Chappuis, F., Dujardin, J.C., Llanos-Cuentas, A. (2007). Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases, 195, 1846–1851. <https://doi.org/10.1086/518041>
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E.M., Ephros, M., Jeronimo, S., Magill, A. (2017). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America

- (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical Infectious Diseases*, 96(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
- Aronson, N., & Joya, C. A. (2019). Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 101–117. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004>
- Ballart, C., Vidal, G., Picado, A., Cortez, M. R., Torrico, F., Torrico, M. C., Godoy, R., Lozano, D., Gállego, M. (2016). Intradomiciliary and peridomiciliary captures of sand flies (Diptera: *Psychodidae*) in the leishmaniasis endemic area of Chapare province, tropic of Cochabamba, Bolivia. *Acta Tropica*, 154(2016), 121–124. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.007>
- Ballesté, R. N. (2018). Proteomics: Technology and Applications. In *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00001-0>
- Bañuls, A. L., Guerrini, F., Le Pont, F., Barrera, C., Espinel, I., Guderian, R., Echeverria, R., Tibayrenc, M. (1997). Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(5), 408–411. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05716.x>
- Bañuls, A, 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*, Vol. 64, pp. 1–113. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)
- Bañuls, AL, Bastien, P., Pomares, C., Arevalo, J., Fisa, R., & Hide, M. (2011). Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 17(10), 1451–1461. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03640.x>
- Bañuls, AL, & Tibayrenc, M. (1999). Molecular epidemiology and evolutionary genetics of infectious diseases. *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*, 29, 1137–1147. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2114-2_3

- Baptista, C., Schubach, A. D. O., Madeira, M. D. F., De Freitas Campos Miranda, L., Guimarães De Souza Pinto, A., Helena Da Silva Barros, J., Conceição-Silva, F., Fernandes Pimentel, M.I., Da Silva Pacheco, R. (2012). Evaluation of genetic polymorphism of *Leishmania* (*V. braziliensis*) isolates obtained from the same patient before and after therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 1–6.
<https://doi.org/10.1155/2012/808132>
- Bastien, P. (2011). Leishmaniasis control: What part for development and what part for research? *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 17, pp. 1449–1450.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03588.x>
- Bastrenta, B., Mita, N., Buitrago, R., Vargas, F., Flores, M., Machane, M., Yacsik, N., Torrez, M., Le Pont, F., Brenière, F. (2003). Human Mixed Infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a Sub Andean Bolivian Area: Identification by Polymerase Chain Reaction/hybridization and Isoenzyme. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(2), 255–264. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000200015>
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bates, P. A. (2018). Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nature Microbiology*, 3(5), 529–530.
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>
- Bermúdez, H., Rojas, E., Garcia, L., Desjeux, P., Dujardin, J. C., Boelaert, M., & Chappuis, F. (2006). Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 100(7), 591–600.
<https://doi.org/10.1179/136485906X118495>
- Bermudez, H., Solano, M., Torrico, M. C., Carballo, M., La Fuente, O., Lara, M., & Paredes, P. (2005). Diagnóstico de Leishmaniasis Utilizando Medio de Cultivo TSTB en Pacientes del Trópico de Cochabamba. *Gac. Med. Bol.*, 28(2), 31–35. Retrieved from
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662005000200006&lng=es&tlng=es

- Bermudez, H.P., Rojas, E., Espada, A. (2002). Manual de atención de leishmaniasis tegumentaria en el trópico de Cochabamba. Centro universitario de Medicina tropical, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. Ed. MOCA. Cochabamba-Bolivia.
- Bermúdez, H., Torrico, F., Rojas, E., Balderrama, F., Le Ray, D., Guerra, H., & Arévalo, J. (1993). Leishmaniasis in the lowlands of Bolivia, prevalence of the disease in two groups of localities with different settlement ages in Carrasco Tropical, Cochabamba - PubMed. Arch Inst Pasteur Tunis, 70(3–4), 443–453. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7802499/>
- Bilbao-Ramos, P., Dea-Ayuela, M., Cardenas-Alegría, O., Salamanca, E., Santalla-Vargas, J., Benito, C., Flores, N., Bolás-Fernández, F. (2017). Leishmaniasis in the major endemic region of Plurinational State of Bolivia: Species identification, phylogeography and drug susceptibility implications. Acta Tropica, 176(2017), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.026>
- Boggild, A. K., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Adai, V., Tulliano, G., Llanos-Cuentas, A., Low, D. E. (2007). Evaluation of a microculture method for isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. Journal of Clinical Microbiology, 45(11), 3680–3684. <https://doi.org/10.1128/JCM.01286-07>
- Boggild, A. K., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Martinez-Medina, D., Llanos-Cuentas, A., & Low, D. E. (2008). Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 79(6), 847–852. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.847>
- Boggild, A. K., Ramos, A. P., Espinosa, D., Valencia, B. M., Veland, N., Miranda-Verastegui, C., Arevalo, J., Low, D.E., Llanos-Cuentas, A. (2010). Clinical and demographic stratification of test performance: A pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 83(2), 345–350. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0414>
- Boité, M., Mauricio, I., Miles, M., & Cupolillo, E. (2012). New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania* (*Viannia*) Parasites Based on Multilocus

- Sequence Analysis. PLoS Negl Trop Dis, 6(11), 1888.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001888>
- Buitrago, R., Cupolillo, E., Bastrenta, B., Le Pont, F., Martinez, E., Barnabé, C., & Brenière, S. F. (2011). PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.019>
- Burza, S., Croft, S., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Caballero, J. D., & Martin, O. (2018). Application of MALDI-TOF in Parasitology. In *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00016-2>
- Camacho, E., Rastrojo, A., Sanchiz, Á., González-De La Fuente, S., Aguado, B., & Requena, J. M. (2019). *Leishmania* mitochondrial genomes: Maxicircle structure and heterogeneity of minicircles. *Genes*, 10(10), 19. <https://doi.org/10.3390/genes10100758>
- Campos-Muñoz, L., Quesada-Cortés, A., Martín-Díaz, M. A., Rubio-Flores, C., & De Lucas-Laguna, R. (2007). *Leishmania braziliensis*: Descripción de un caso pediátrico importado con respuesta a anfotericina B liposomal. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 98(1), 42–44.
[https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(07\)70007-8](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(07)70007-8)
- Canal Aranda, M., Gómez Martínez, J., & Salvado Costa, M. (2014). Cost-effectiveness study of the application of MALDI-TOF MS technique in the identification of atypical mycobacteria. In *Gest y Eval Cost Sanit*. Retrieved from
https://www.fundacionsigno.com/archivos/publicaciones/06_Coste_efectividad_MALDI_TOF.pdf
- Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M., & Otranto, D. (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitology*, 31(3), 100–108.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.012>
- Cantanhêde, L. M., Mattos, C. B., Cruz, A. K., Ikenohuchi, Y. J., Fernandes, F. G., Medeiros, E. H. R. T., Da Silva-Júnior, C., Ferreira, R. de G. M. (2021). Overcoming the negligence in

- laboratory diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Pathogens*, 10(9).
<https://doi.org/10.3390/pathogens10091116>
- Cao, D. P., Guo, X. G., Chen, D. L., & Chen, J. P. (2011). Species delimitation and phylogenetic relationships of Chinese *Leishmania* isolates reexamined using kinetoplast cytochrome oxidase II gene sequences. *Parasitology Research*, 109(1), 163–173.
<https://doi.org/10.1007/s00436-010-2239-6>
- Carstens-Kass, J., Paulini, K., Lypaczewski, P., & Matlashewski, G. (2021). A review of the leishmanin skin test: A neglected test for a neglected disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009531>
- Carvalho, J. de P., Silva, S. N., Freire, M. L., Alves, L. L., de Souza, C. S. A., & Cota, G. (2022). The cure rate after different treatments for mucosal leishmaniasis in the Americas: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010931>
- Cassagne, C., Pratlong, F., Jeddi, F., Benikhlef, R., Aoun, K., Normand, A. C., Faraut, F., Bastien, P., Piarroux, R. (2014). Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6), 551–557. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12387>
- Castilho, T. M., Shaw, J. J., & Floeter-Winter, L. M. (2003). New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 41(2), 540–546. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.540-546.2003>
- Chaouch, M., Fathallah-Mili, A., Driss, M., Lahmadi, R., Ayari, C., Guizani, I., Ben Said, M., BenAbderrazak, S. (2013). Identification of Tunisian *Leishmania* spp. by PCR amplification of cysteine proteinase B (cpb) genes and phylogenetic analysis. *Acta Tropica*, 125(3), 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.11.012>
- Chouicha, N., Lanotte, G., Pratlong, F., Cuba Cuba, C. A., Velez, I. D., & Dedet, J. P. (1997). Phylogenetic taxonomy of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* based on isoenzymatic study of 137 isolates. *Parasitology*, 115(4), 343–348.
<https://doi.org/10.1017/S0031182097001376>

- Clark, A., Kaleta, E., Arora, A., & Wolk, D. (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 547–603.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>
- Conter, C., Mota, C., Andreo dos Santos, B., De Souza Braga, L., De Souza Terron, M., Rocha Navasconi, T., Bekner Silva Fernandes, A.C., Galhardo Demarchi, I., Reinhold de Castro, K.R., Alessi Aristides, S.M., Campana Lonardoní, M.V.Vieira Teixeira, J.J., Verzignassi Silveira, T. (2019). PCR primers designed for new world *Leishmania*: A systematic review. *Experimental Parasitology*, 207(2019), 107773.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107773>
- Croft, S., Sundar, S., & Fairlamb, A. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 19(1), 111–126. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
- Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- Cuba Cuba, A. C. (2000). Diagnóstico Parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 17(1–4), 39–52.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2000.171-4.749>
- Cubas, W., Centeno-Leguía, D., Arteaga-Livias, K., & Depaz-López, E. (2019). Revisión clínica y epidemiológica de la leishmaniasis tegumentaria en una región central del Perú. *Revista Chilena de Infectología*, 36(6), 707–715. Retrieved from
<https://revinf.cl/index.php/revinf/article/view/160/298>
- Culha, G., Akyar, I., Yildiz Zeyrek, F., Kurt, Ö., Gündüz, C., Özensoy Töz, S., Östan, I., Cavus, I., Gülkan, B., Kocagöz, T., Özbel, Y., Özbilgin, A. (2014). Leishmaniasis in Turkey: Determination of *Leishmania* species by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Iranian Journal of Parasitology*, 9(2), 239–248.

- Cupolillo, E. (2020). Parásitos. In Atlas interactivo de Leishmaniasis en las Américas Aspectos clínicos. y diagnósticos diferenciales (pp. 20–42). Retrieved from <https://www.paho.org/es/documentos/atlas-interactivo-leishmaniasis-americas-aspectos-clinicos-diagnosticos-diferenciales>
- Cupolillo, E., Grimaldi, G., Momen, H., & Beverley, S. (1995). Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73(1–2), 145–155. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00108-D](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00108-D)
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., & Grimaldi, G. (2000). A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, Vol. 16, pp. 142–144. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01609-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01609-9)
- Cupolillo, E., Momen, H., & Grimaldi Jr, G. (1998). Genetic Diversity in Natural Populations of New World *Leishmania*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 663–668. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000500018>
- Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>
- David, C., Dimier-David, L., Vargas, F., Torrez, M., Dedet, J. P., & Dedet, J. P. (1993). Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: A retrospective study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(1), 7–9. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90398-A](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90398-A)
- Dawit, G., Girma, Z., & Simenew, K. (2013). A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 04(02), 2–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000166>
- De Almeida, M. E., Steurer, F. J., Koru, O., Herwaldt, B. L., Pieniazek, N. J., & Da Silva, A. J. (2011). Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of *rRNA* internal transcribed spacer 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3143–3149. <https://doi.org/10.1128/JCM.01177-11>
- De Almeida, J. V, De Souza, C. F., Fuzari, A. A., Joya, C. A., Valdivia, H. O., Bartholomeu, D. C., & Brazil, R. P. (2021). Diagnosis and identification of *Leishmania* species in patients

- with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil's Amazon Region. *Parasites and Vectors*, 14(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04539-8>
- De Mello, C. X., De Oliveira Schubach, A., De Oliveira, R. V. C., Conceição-Silva, F., Pimentel, M. I. F., Lyra, M. R., Camargo, F., De Fátima Madeira, M. (2011). Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology Research*, 109(3), 927–933. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2335-2>
- De Vries, H., Reedijk, S., & Schallig, H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*, 16(2), 99–109. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
- De Vries, H., & Schallig, H. (2022). Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *American Journal of Clinical Dermatology*, 23(6), 823–840. <https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8>
- Dedet, J. P., Melogno, R., Cardenas, F., Valda, L., David, C., Fernandez, V., Torrez, M.E., Dimier-David, L., Lyevre, P., Villareal, M. E. (1995). Rural campaign to diagnose and treat mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Bulletin of the World Health Organization*, 73(3), 339–345.
- Del Rosal, T., Artigao, F. B., Miguel, M. J. G., de Lucas, R., & del Castillo, F. (2009). Successful treatment of childhood cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B: Report of two cases. *Journal of Tropical Pediatrics*, 56(2), 122–124. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmp073>
- Delgado, O., Castes, M., White, A. C., & Kreutzer, R. D. (1993). *Leishmania colombiensis* in Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(1), 145–147. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1993.48.145>
- Desjeux, P., Le Pont, F., & Mollinedo, S. (1986). Leishmaniasis visceral en el departamento de La Paz, Bolivia. Retrieved March 7, 2023, from http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers11-08/23744.pdf
- Desjeux, P., Mollinedo, S., Le Pont, F., Paredes, A., & Ugarte, G. (1987). Cutaneous leishmaniasis in Bolivia. A study of 185 human cases from Alto Beni (La Paz Department).

- Isolation and isoenzyme characterization of 26 strains of *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81(5), 742–746. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90014-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90014-9)
- Dimier-David, L., David, C., Ravisse, P., Bustillos, R., Revollo, S., Lyèvre, P., Munoz, M., Vargas, F., Dedet, J.-P. (1991). Parasitological diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania b. braziliensis* in Bolivia. Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 24(4), 231–234.
- DNDi. (2017). InfoLEISH Boletín informativo de la redLEISH-2a edición. Retrieved from https://dndi.org/wp-content/uploads/2016/09/DNDi_InfoLeish_Newsletter_02_ESPANOL_1705.pdf
- DNDi. (2018). InfoLEISH Boletín informativo de la redLEISH-3a edición. Retrieved from https://dndi.org/wp-content/uploads/2018/07/InfoLeish_Newsletter_June2018_ESP.pdf
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. Parasites and Vectors, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- Ducharme, O., Simon, S., Ginouves, M., Prévot, G., Couppie, P., Demar, M., & Blaizot, R. (2020). *Leishmania naiffi* and *lainsoni* in french guiana: Clinical features and phylogenetic variability. PLoS Neglected Tropical Diseases, 14(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008380>
- Dujardin, J., Bañuls, A., Llanos-Cuentas, A., Lvarez, E., DeDoncker, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Arevalo, J., Tibayrenc, M. (1995). Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. Acta Tropica, 59(4), 293–307. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(95\)00094-U](https://doi.org/10.1016/0001-706X(95)00094-U)
- Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Shaw, J. J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology, 145(4), 430–442. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>
- Evers, D. L., Frye, F. A., & Weina, P. J. (2018). A simple empirical algorithm to distinguish among *Leishmania brasiliensis*, *major*, and *tropica* species by MALDI-TOF mass

spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 148, 46–48.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.12.009>

Fagundes-Silva, G. A., Romero, G. A. S., Cupolillo, E., Yamashita, E. P. G., Gomes-Silva, A., Guerra, J. A. de O., & Da-Cruz, A. M. (2015). *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(6), 797–800.

<https://doi.org/10.1590/0074-02760150128>

Fayaz, S., Fard-Esfahani, P., Bahrami, F., Parvizi, P., & Ajdary, S. (2021). High resolution melting assay in discrimination of the main etiologic agents of leishmaniasis in Iran.

Iranian Journal of Microbiology, 13(1), 137–144. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5505>

Fernández-Arévalo, A., Ballart, C., Muñoz-Basagoiti, J., Basarte, L., Lobato, G., Arnau, A., Abras, A., Tebar, S., Llovet, T., Lami, P., Pratlong, F., Alsina, M., Roe, E., Puig, L., Muñoz, C., Gállego, M. (2022). Autochthonous and imported tegumentary leishmaniasis in Catalonia (Spain): Aetiological evolution in the last four decades and usefulness of different typing approaches based on biochemical, molecular and proteomic markers. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(3), 1404–1418.

<https://doi.org/10.1111/tbed.14107>

Fernández-Arévalo, A., El Baidouri, F., Ravel, C., Ballart, C., Abras, A., Lachaud, L., Tebar, S., Lami, P., Pratlong, F., Gállego, M., Muñoz, C. (2020). The *Leishmania donovani* species complex: A new insight into taxonomy☆. *International Journal for Parasitology*, 50(13), 1079–1088.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.013>

Flaih, M. H., Al-Abady, F. A., & Hussein, K. R. (2021). Phylogenetic analysis of kinetoplast DNA: kDNA of *Leishmania tropica* in Thi-Qar province, Iraq. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 78, 1–13.

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101696>

Folgueira, C., Cañavate, C., Chicharro, C., & Requena, J. M. (2007). Genomic organization and expression of the hsp70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology*,

134(3), 369–377. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001570>

Fotouhi-Ardakani, R., Dabiri, S., Ajdari, S., Alimohammadian, M. H., AlaeNovin, E., Taleshi, N., & Parvizi, P. (2016). Assessment of nuclear and mitochondrial genes in precise

identification and analysis of genetic polymorphisms for the evaluation of *Leishmania* parasites. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 33–41.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.011>

Fraga, J, Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>

Fraga, J, Montalvo, A. M., Maes, I., Dujardin, J., & Van der Auwera, G. (2013). *HindIII* and *SduI* digests of heat-shock protein 70 PCR for *Leishmania* typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 77(3), 245–247. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.023>

Fraga, Jorge, Montalvo, A. M., Van der Auwera, G., Maes, I., Dujardin, J. C., & Requena, J. M. (2013). Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 18(October), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.020>

Franco-Álvarez de Luna, F. (2018). Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Fungal Diagnosis. In *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00014-9>

Garcia, A. L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arevalo, J., Quispe, K.W., Dujardin, J. (2004). Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>

Garcia, A. L., Kindt, A., Quispe-Tintaya, K. W., Bermudez, H., Llanos, A., Arevalo, J., Bañuls, A.L., De Doncker, S., Le Ray, D., Dujardin, J. C. (2005). American tegumentary leishmaniasis: Antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infection, Genetics and Evolution*, 5(2), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.07.003>

Garcia, A. L., Parrado, R., De Doncker, S., Bermudez, H., & Dujardin, J. (2007a). American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive

- clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101(4), 368–371.
<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.06.009>
- García, A. L., Tellez, T., Parrado, R., Rojas, E., Bermudez, H., & Dujardin, J. (2007b). Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(12), 1208–1213. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.002>
- García, A., Parrado, R., Rojas, E., Delgado, R., Dujardin, J. C., & Reithinger, R. (2009). Leishmaniasis in Bolivia: Comprehensive review and current status. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(5), 704–711.
<https://doi.org/10.4269/AJTMH.2009.80.704>
- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista Chilena de Infectología*, Vol. 29, pp. 263–272.
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000300003>
- Gomez, M., Castro, M., & Saravia, N. (2020). Inmunopatogénesis de las leishmaniasis. In *Atlas interactivo de Leishmaniasis en las Américas Aspectos clínicos. y diagnósticos diferenciales* (pp. 82–99). Retrieved from <https://www.paho.org/es/documentos/atlas-inte>
- Goto, H., & Lauletta Lindoso, J. A. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(4), 419–433.
<https://doi.org/10.1586/eri.10.19>
- Gow, I., Smith, N. C., Stark, D., & Ellis, J. (2022). Laboratory diagnostics for human *Leishmania* infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods. *Parasites and Vectors*, 15(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05524-z>
- Grimaldi, G. J. R., Tesh, R. B., & McMahon-Pratt, D. (1989). A review of geographic distribution of Leishmaniasis in the world.pdf. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(6), 687–725. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.687>

- Gyorkos, T., Nicholls, R., Montresor, A., Luciañez, A., Casapia, M., St-Denis, K., Blouin, B., Joseph, S. (2023). Eliminating morbidity caused by neglected tropical diseases by 2030. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, 1. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2023.16>
- Hamad, S. H., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., Abebe, T., Younis, B. M., Elthair, EL-Hassan, A.M., Hailu, A. and Bart, A. (2011). *Leishmania*: Probable genetic hybrids between species in Sudanese isolates. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3, 142–145. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/JMA>
- Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., & Agabian, N. (1998). Single-step multiplex PCR assay for characterization of new world *Leishmania* complexes. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 1989–1995. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.7.1989-1995.1998>
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561), 1852–1858. <https://doi.org/10.1126/science.1068408>
- Hernández, C., Alvarez, C., González, C., Ayala, M. S., León, C. M., & Ramírez, J. D. (2014). Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0501-y>
- Herrera, G., Barragán, N., Luna, N., Martínez, D., De Martino, F., Medina, J., Niño, S., Páez, L., Ramírez, A., Vega, L., Velandia, V., Vera, M., Zúñiga, M.F., Bottin, M.J.Ramírez, J. D. (2020a). An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. *Scientific Data*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0451-5>
- Herrera, G., Bottin, M., Barragán, N., Luna, N., Martínez, D., De Martino, F., Medina, J., Niño, S., Páez, L., Ramírez, A., Vega, L., Velandia, V., Vera, M., Zúñiga, M.F., Ramírez, J. D. (2020b). *Leishmania* in the Americas DB (p. 1). p. 1. https://doi.org/https://doi.org/10.34848/FK2_leshmania_ds/LRA8AD
- Hoyos, J., Rosales-Chilama, M., León, C., González, C., & Gómez, M. A. (2022). Sequencing of *hsp70* for discernment of species from the *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* complex from endemic areas in Colombia. *Parasites and Vectors*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05438-w>

- Ibrahim, M. E., & Barker, D. C. (2001). The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. *Infection, Genetics and Evolution*, 1(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(01\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(01)00009-0)
- Jara, M., Aduai, V., Valencia, B. M., Martinez, D., Alba, M., Castrillon, C., Medina, J., Niño, S., Páez, L., Ramírez, A., Vega, L., Velandia, V., Vera, M., Zúñiga, M.F., Arevalo, J. (2013). Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1826–1833. <https://doi.org/10.1128/JCM.00208-13>
- Jauk F. (2019). Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones Next-Generation Sequencing (NGS): basic concepts and applications. *HEMATOLOGÍA*, 23(XXIV), 21–38. Retrieved from http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol23/n2_educacional/2-ROL_DE_NGS_EN_PATOLOGIA_MIELOIDE-jauk-n23-ext.pdf
- Jorquera, A., González, R., Marchán-Marcano, E., Oviedo, M., & Matos, M. (2005). Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(1), 43–46. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000100008>
- Kato, H., Cáceres, A. G., Seki, C., Silupu García, C. R., Holguín Mauricci, C., Castro Martínez, S. C., Moreno Paico, D., Castro Muniz, J.L., Troyes Rivera, L.D., Villegas Briones, Z.I., Guerrero Quincho, S., Sulca Jayo, G.L., Tineo Villafuerte, E., Manrique de Lara Estrada, C., Arias, F.R., Passara, F.S., Ruelas Llerena, N., Kubo, M., Tabbabi, A., Daisuke S. Y., Hashiguchi, Y. (2019). Further insight into the geographic distribution of *Leishmania* species in Peru by cytochrome b and mannose phosphate isomerase gene analyses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007496. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007496>
- Kato, H., Gomez, E. A., Martini-Robles, L., Muzzio, J., Velez, L., Calvopiña, M., Romero-Alvarez, D., Mimori, T., Uezato, H., Hashiguchi, Y. (2016). Geographic Distribution of *Leishmania* Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis.

- PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(7), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004844>
- Kaufer, A., Barratt, J., Stark, D., & Ellis, J. (2019). The complete coding region of the maxicircle as a superior phylogenetic marker for exploring evolutionary relationships between members of the Leishmaniinae. *Infection, Genetics and Evolution*, 70(January), 90–100.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.002>
- Kaufer, A., Stark, D., & Ellis, J. (2020). A review of the systematics, species identification and diagnostics of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. *International Journal for Parasitology*, 50(6–7), 449–460.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.003>
- Kazemi, B. (2011). Genomic organization of *Leishmania* species. *Iranian Journal of Parasitology*, 6(3), 1–18.
- Kerr, S. F., Emmons, L. H., Melby, P. C., Liu, C., Perez, L. E., Villegas, M., & Miranda, R. (2006). *Leishmania amazonensis* infections in *Oryzomys acritus* and *Oryzomys nitidus* from Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(6), 1069–1073.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.1069>
- Killick-Kendrick, R. (1990). The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 65(SUPPL. 1), 37–42. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990651037>
- Kocher, A., Valiere, S., Bañuls, A.-L., & Murienne, J. (2018). High-throughput sequencing of *kDNA* amplicons for the analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. *Parasitology*, 145(5), 585–594.
<https://doi.org/10.1017/S0031182017002013>
- Kreutzer, R. D., Corredor, A., Grimaldi, G., Grogl, M., Rowton, E. D., Young, D. G., Morales, A., McMahon-Pratt, D., Guzman, H., Tesh, R. B. (1991). Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. N (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting human, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44(6), 662–675.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.662>

- Kuhls, K., Cupolillo, E., Silva, S. O., Schweynoch, C., Côrtes Boité, M., Mello, M. N., Mauricio, I., Miles, M., Wirth, T., Schönian, G. (2013). Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania* (*Viannia*). PLoS Neglected Tropical Diseases, 7(10), 1–14.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002490>
- Kuhls, K., Mauricio, I. L., Pratlong, F., Presber, W., & Schönian, G. (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. Microbes and Infection, 7(11–12), 1224–1234.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.009>
- Kumar, A., Boggula, V. R., Misra, P., Sundar, S., Shasany, A. K., & Dube, A. (2010). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis is useful for distinguishing *Leishmania* species of visceral and cutaneous forms. Acta Tropica, 113(2), 202–206.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.006>
- Lachaud, L., Fernández-Arévalo, A., Normand, A.-C., Lami, P., Nabet, C., Donnadiou, J. L., Piarroux, M., Djenad, F., Cassagne, C., Ravel, C., Tebar, S., Llovet, T., Blanchet, D., Demar, M., Harrat, Z., Aoun, K., Bastien, P., Muñoz, C., Gállego, M., Piarroux, R. (2017). Identification of *Leishmania* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using a Free Web-Based Application and a Dedicated Mass-Spectral Library. Journal of Clinical Microbiology, 55(10), 2924–2933.
<https://doi.org/10.1128/JCM>
- La Fuente, C., Recacoechea, M., Tibayrenc, M., Urjel, R., Darras, C., Cardozo, L (1986). Leishmaniosis en Bolivia: presencia de dos complejos de *Leishmania* en los Llanos Orientales del Departamento de Santa Cruz-Bolivia. Bol. Científico Centro Enfermedades Trop. 1986; 12:1–15.
- Lainson, R. (2010). The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 1(2), 13–32.
<https://doi.org/10.5123/s2176-62232010000200002>
- Lainson, R., & Shaw, J. J. (1987). The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press.

- Le Pont, F., & Desjeux, P. (1986). Leishmaniasis in Bolivia. II. The involvement of *Psychodopygus yucumensis* and *Psychodopygus llanosmartinsi* in the selvatic transmission cycle of *Leishmania braziliensis braziliensis* in a lowland subandean region. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 81, pp. 311–318. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761986000300007>
- Le Pont, F., Desjeux, P., Torres Espejo, J., Fournet, A., & Mouchet, J. (1992). Leishmanioses et Phlebotomes en Bolivie.
- Le Pont, F., Mollinedo, S., Mouchet, J., & Desjeux, P. (1989a). Leishmaniasis in Bolivia. IV. The dog in the cycles of leishmaniasis in Bolivia. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 84(3), 417–421. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761989000300019>
- Le Pont, F., Mouchet, J., & Desjeux, P. (1989b). Leishmaniasis in Bolivia. VII. Infection of sentinel porcupines (*Coendou prehensilis*, L.) by *Leishmania* (Le.) *chagasi*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 84, p. 575. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000400017>
- Liébana-Martos, C. (2018). Indications, Interpretation of Results, Advantages, Disadvantages, and Limitations of MALDI-TOF. In *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814451-0.00005-8>
- Llanos-Cuentas, A. (2020). Leishmaniasis Mucosa. In *Atlas interactivo de Leishmaniasis en las Américas Aspectos clínicos. y diagnósticos diferenciales* (pp. 356–442). Retrieved from <https://www.paho.org/es/documentos/atlas-interactivo-leishmaniasis-americas-aspectos-clinicos-diagnosticos-diferencialeswww.ins.gov.co>
- Llanos-Cuentas, A., Tulliano, G., Araujo-Castillo, R., Miranda-Verastegui, C., Santamaria-Castrellon, G., Ramirez, L., Lazo, M., De Doncker, S., Boelaert, M., Robays, J., Dujardin, J.C., Arevalo, J., Chappuis, F. (2008). Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 223–231. <https://doi.org/10.1086/524042>.
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, 1(4), 495–502. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.495-502.2002>

- Lukeš, J., Mauricio, I., Schönián, G., Dujardin, J., Soteriadou, K., Dedet, J., Kuhls, K., Quispe, K.W., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F., Miles, M. (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9375–9380.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703678104>
- Luna, V., Chuquimia, G., Parra, R., Palacios, J., Neves, M., & Carvalho-Costa, F. (2012). Active surveillance of American tegumentary leishmaniasis in endemic areas in rural Bolivia. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(1), 30–34.
- Maazoun, R., Lanotte, G., Pasteur, N., Rioux, J., Kennou, M. F., Pratlong, F., & Bayar, N. (1981). Écologie des Leishmanioses dans le sud de la France. *Annales de Parasitologie (Paris)*, 56(2), 131–146.
- Maia-Elkhoury, A. N. S., Magalhães Lima, D., Salomón, O. D., Buzanovsky, L. P., Saboyá-Díaz, M. I., Valadas, S. Y. O. B., & Sanchez-Vazquez, M. J. (2021). Interacción entre los determinantes medioambientales y socioeconómicos para el riesgo para leishmaniasis cutánea en América Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 45, 1–10.
<https://doi.org/10.26633/rpsp.2021.49>
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2018). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, 22(1), 35–45.
<https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>
- Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A. F., Newman, S., Ramanan, P., & Suarez, J. A. (2021). A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Current Tropical Medicine Reports*, 8(2), 121–132. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>
- Marco, J. D., Barroso, P. A., Mimori, T., Locatelli, F. M., Tomatani, A., Mora, M. C., Cajal, S.P., Nasser, Julio R., Parada, L.A., Taniguchi, T., Korenaga, M., Basombrío, M.A., Hashiguchi, Y. (2012). Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania*

- species from Argentina. *BMC Infectious Diseases*, 12(May). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-191>
- Marcondes, M., & Day, M. J. (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*, 123, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>
- Marlow, M. A., Boité, M. C., Ferreira, G. E. M., Steindel, M., & Cupolillo, E. (2014). Multilocus Sequence Analysis for *Leishmania braziliensis* Outbreak Investigation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002695>
- Martinez, E., Le pont, F., Torrez, M., Telleria, J., Vargas, F., Muñoz, M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., Dujardin, J. P. (1998). A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis* in a Sub Andean region of Bolivia. *Acta Tropica*, 71(October), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00049-7)
- Martinez, E., Mollinedo, S., Torrez, M., Muñoz, M., & Bañuls, A. L. (2002). Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 529–532. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90428-1](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90428-1)
- Mathison, B. A., & Bradley, B. T. (2022). Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. *Laboratory Medicine*, 54(4), 363–371. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmac134>
- Maurício, I. L. (2018). *Leishmania* Taxonomy. In Fabrizio Bruschi (Ed.), *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases* (pp. 15–30). https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_2
- Mauricio, I. L., Gaunt, M. W., Stothard, J. R., & Miles, M. A. (2007). Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37(5), 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.020>

- Mauricio, I., Stothard, J., & Miles, M. (2004). *Leishmania donovani* complex: Genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. *Parasitology*, 128(3), 263–267. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004578>
- Mendes, A., Filgueira, C. P., De Freitas Campos Miranda, L., De Almeida, A. B., Cantanhêde, L. M., Fagundes, A., Pereira, S.A., Menezes, R.C., Cupolillo, E. (2023). First report of *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* in south american territory and confirmation of *Leishbunyavirus* infecting this parasite in a mare. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 118(CI), 1–7. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220220>
- Mendes, R. B., De Oliveira Cardoso, M. J., Fortes De Brito, R. C., Coura-Vital, W., De Oliveira Aguiar-Soares, R. D., & Barbosa Reis, A. (2020). MINI-REVIEW Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8965–8977. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w>
- Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia. (2015a). Norma nacional y manual de procedimientos técnicos de leishmaniasis. Serie: Documentos Técnicos Normativos No 364, pp. 1–91. Retrieved from https://www.minsalud.gob.bo/images/Documentacion/dgss/Epidemiologia/Leishmaniasis/365-Norma_Nacional_y_Manual_de_Procedimientos_Tenicos_de_Leishmaniasis-2015.pdf
- Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia. (2016). Anuario Epidemiología 2016. Programa Nacional de Vigilancia y Control de Leishmaniasis. Retrieved from <https://www.minsalud.gob.bo/component/jdownloads/?task=download.send&id=99&catid=9&m=0&Itemid=646>
- Ministerio de Salud del Estado Plurinacional de Bolivia. (2015b). Revista epidemiologica-Leishmaniasis, 2015. Retrieved from <https://www.minsalud.gob.bo/index.php/component/jdownloads/?task=download.send&id=98&catid=0&m=0&Itemid=0>
- Ministerio de Salud del Perú. (2021). Boletín epidemiológico del Perú 2021. In Situación epidemiológica de Leishmaniasis en el Perú 2020-2021. Retrieved from https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_20215.pdf

- Mokni, M. (2019). Cutaneous leishmaniasis. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 146(3), 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>
- Mollinedo, J., Mollinedo, Z., Magne, M., Gironde, W. J., & Salomon, O. D. (2020a). Leishmaniasis en Bolivia, revisión y estado actual en Tarija, frontera con Argentina. *Biomedica*, 40(Supl. 1), 45–61. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4990>
- Mollinedo, Z., & Mollinedo, S. (2020b). Leishmaniasis en Bolivia. *Rev Med (La Paz)*, 26(1), 50–66. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/pdf/rmcmlp/v26n1/v26n1_a09.pdf
- Momen, H., Grimaldi, G., Pacheco, R. S., Jaffe, C. L., McMahon-Pratt, D., & Marzochi, M. C. (1985). Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(6), 1076–1084. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.1076>
- Montalvo, A., Fraga, J., Montano, I., Monzote, L., Van der Auwera, G., Marín, M., & Muskus, C. (2016). Identificación molecular con base en el gen *hsp70* de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp en Colombia. *Biomedica*, 36(Supl.1), 37–44. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688>
- Montalvo, A., Fraga, J., Monzote, L., García, M., & Fonseca, L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(2), 108–131. Retrieved from <http://scielo.sld.cu>
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J., & Van Der Auwera, G. (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*, 137(8), 1159–1168. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000089>
- Montalvo, A. M., Monzote, L., Fraga, J., Montano, I., Muskus, C., Marín, M., De Doncker, S., Vélez, I.D., Dujardin, J. (2008). [PCR-RFLP and RAPD for typing neotropical *Leishmania*]. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 28(4), 597–606. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19462565>
- Montealegre S., I. A. (2010). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de leishmaniasis. *Nova*, 8(14), 128–132. <https://doi.org/10.22490/24629448.444>

- Moreira, O. C., Yadon, Z. E., & Cupolillo, E. (2018). The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Tropica*, 184, 29–37.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020>
- Mota, C., Conter, C., Lonardoni, M., Aristides, S., & Silveira, T. (2018). Development of a Real-Time PCR for *Leishmania* detection and identification by melting curve analysis targeting the small subunit *rRNA* gene. *International Journal of Infectious Diseases*, 73, 303–304.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.4106>
- Mouri, O., Morizot, G., Van der Auwera, G., Ravel, C., Passet, M., Chartrel, N., Joly, I., Thellier, M., Jauréguiberry, S., Caumes, E., Mazier, D., Marinach-Patrice, C., Buffet, P. (2014). Easy Identification of *Leishmania* Species by Mass Spectrometry. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002841>
- Murray, H., Berman, J., Davies, C., & Saravia, N. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, Vol. 366, pp. 1561–1577. Retrieved from [10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)
- Muskus, C. E., & Marín Villa, M. (2002). Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biomédica*, 22(2), 167.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1156>
- Naiff, R. D., Talhari, S., & Barrett, T. V. (1988). Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83(4), 529–530. Retrieved from <https://www.scielo.br/j/mioc/a/6mXwtCyd8GnDvRykbv9ykHj/?format=pdf&lang=en>
- Nasereddin, A., & Jaffe, C. L. (2010). Rapid diagnosis of old world leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7sl RNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2240–2242. <https://doi.org/10.1128/JCM.00553-10>
- Nocua, P., Ramírez, C., Requena, J. M., & Puerta, C. J. (2011). Secuencia parcial del genoma del maxicírculo de *Leishmania braziliensis*, comparación con otros tripanosomátidos. *Universitas Scientiarum*, 16(1), 29. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc16-1.mgps>
- Nolder, D., Roncal, N., Davies, C., Llanos-Cuentas, A., & Miles, M. (2007). Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *American*

- Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 76(3), 573–578.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.573>
- Nzelu, C. O., Kato, H., & Peters, N. C. (2019). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. PLoS Neglected Tropical Diseases, 13(11), 1–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007698>
- Odiwuor, S., De Doncker, S., Maes, I., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2011). Natural *Leishmania donovani/Leishmania aethiopica* hybrids identified from Ethiopia. Infection, Genetics and Evolution, 11(8), 2113–2118. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.026>
- Odiwuor, S., Veland, N., Maes, I., Arévalo, J., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2012). Evolution of the *Leishmania braziliensis* species complex from amplified fragment length polymorphisms, and clinical implications. Infection, Genetics and Evolution, 12(8), 1994–2002. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.028>
- OMS. (2010). Control de las leishmaniasis: Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis. In OMS, Serie de informes técnicos; 949. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/82766>
- OPS-OMS. (2018). Leishmaniasis Tegumentaria en las Américas - Diagnóstico y Tratamiento. Organización Panamericana de La Salud - Organización Mundial de La Salud, pp. 1–41. Retrieved from <https://docs.bvsalud.org/oer/2018/10/3809/u1-leish02.pdf>
- OPS/OMS. (2019). Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. In OPS/OMS. Retrieved from https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf
- OPS/OMS. (2022a). Directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas (OPS, Ed.). Retrieved from https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56121/9789275325032_spa.pdf?sequence=15&isAllowed=y
- OPS/OMS. (2022b). Leishmaniasis: Informe epidemiológico en las Américas. No 11. Retrieved from <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56833>

- OPS. (2020). Atlas interactivo de Leishmaniasis en las Américas. Aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales. In Organización Mundial de la Salud. Retrieved from <https://www.paho.org/es/documentos/atlas-interactivo-leishmaniasis-americas-aspectos-clinicos-diagnosticos-diferenciales>
- OPS/OMS. (2023). Manual de procedimientos para la vigilancia y el control de las leishmaniasis en la Región de las Américas. In Organización Panamericana de la Salud, 2023 (Segunda ed). <https://doi.org/10.37774/9789275327340>.
- OPS. (2021). Leishmaniasis. Informe epidemiológico de las Américas No10. Retrieved from <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55344>
- OPS/OMS. (2017). Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the Americas 2017-2022. OPS/OMS, p. 70. Retrieved from <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34147>
- OPS. (2013). Leishmaniasis en las Américas: Recomendaciones para el tratamiento. pp. 11–14. Retrieved from <https://iris.paho.org/handle/10665.2/7704>
- Orlando, T., Rubio, M., Sturm, N., Campbell, D., & Floeter-Winter, L. (2002). Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5), 695–701. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500020>
- Pagheh, A., Fakhar, M., Mesgarian, F., Gholami, S., & Ahmadpour, E. (2014). An improved microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitic Diseases*, 38(4), 347–351. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0316-3>
- Peláez-Sánchez, R. G. (2012). mecanismos de resistencia utilizados por *Leishmania* spp. frente al tratamiento con medicamentos leishmanicidas Proteínas asociadas con resistencia a medicamentos leishmanicidas. II Simposio Instituto de Medicina Tropical, (December), 158–178.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., Sacks, D. (2008). In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for

- Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science*, 321(5891), 970–974.
<https://doi.org/10.1126/science.1159194>
- Pita-Pereira, D., Lins, R., Oliveira, M. P., Lima, R. B., Pereira, B. A. S., Moreira, O. C., Brazil, R.P., Britto, C. (2012). SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-15>
- Polley, S. D., Watson, J., Chiodini, P. L., & Lockwood, D. N. J. (2018). Visceral leishmaniasis in traveler to Guyana caused by *Leishmania siamensis*, London, UK. *Emerging Infectious Diseases*, 24(1), 155–156. <https://doi.org/10.3201/eid2401.161428>
- Pombi, M., Giacomi, A., Barlozzari, G., Mendoza-Roldan, J., Macri, G., Otranto, D., & Gabrielli, S. (2020). Molecular detection of *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* in human blood and *Leishmania (Leishmania) infantum* in *Sergentomyia minuta* : unexpected host-parasite contacts. *Medical and Veterinary Entomology*, 34(4), 470–475.
<https://doi.org/10.1111/mve.12464>
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A.W., Mwenechanya, R., Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Prates, F., Dourado, M. E. F., Silva, S. C., Schriefer, A., Guimarães, L. H., Das Graças, M., Brito, O., Almeida, J., Carvalho, E.M., Machado, P. R. L. (2016). Fluconazole in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*: A Randomized Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 64, 67–71.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw662>
- Puri, M., Brar, H. K., Mittal, N., Madan, E., Srinivasan, R., Rawat, K., Moulik, S., Chatterjee, M., Gorthi, S.S., Muthuswami, R., Madhubala, R. (2021). Rapid diagnosis of *Leishmania* infection with a portable loop-mediated isothermal amplification device. *Journal of Biosciences*, 46(4), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00211-0>

- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A. H., Das, S., Kumar, S., Pandey, K., Ravidas, V., Kumar, M., De, T., Singh, D., Das, P. (2012). Mechanism of Amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 1031–1041. <https://doi.org/10.1128/AAC.00030-11>
- Quiroga, C., Cevallos, V., Morales, D., Baldeón, M. E., Cárdenas, P., Rojas-Silva, P., & Ponce, P. (2017). Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. *Journal of Medical Entomology*, 54(6), 1704–1711. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx122>
- Quispe Tintaya, K. W., Ying, X., Dedet, J. P., Rijal, S., De Bolle, X., & Dujardin, J. C. (2004). Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: Polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *Journal of Infectious Diseases*, 189(6), 1035–1043. <https://doi.org/10.1086/382049>
- Ramírez, J., Agudelo, S., Muskus, C., Alzate, J. F., Berberich, C., Barker, D. C., & Vélez, I. D. (2002). The method used to sample ulcers influences the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(SUPPL. 1), S169. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90071-4](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90071-4)
- Ramírez, J. D., Hernández, C., León, C. M., Ayala, M. S., Flórez, C., & González, C. (2016). Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific Reports*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep28266>
- Ready, P. D. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Revollo, S., Dimier-David, L., Lyevre, P., Camacho, C., & Dedet, J. P. (1992). Isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* isolates obtained from Bolivian and Peruvian

- patiens. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 86, 388–391. Retrieved from <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/12482/RevolloIsoenzyme.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Riesco, M. R., Quintana, A. M., López, E. F., Herce, N. I., Santos-Briz, A., & Pérez, P. U. (2007). Ulcerative infiltrated plaques in a Bolivian boy. *Pediatric dermatology*, 24(6), 657–658. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2007.00559.x>
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratloug, F., Bastien, P., & Perieres., J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, 65(3), 111–125.
- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T.D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J.C., Berriman, M., Smith, D.F., Hertz-Fowler, C., Mottram, J. C. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*, 21(12), 2129–2142. <https://doi.org/10.1101/gr.122945.111>
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A. J., & Bates, P. A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430(6998), 463–467. <https://doi.org/10.1038/nature02675>
- Rojas C., E., Verduguez-Orellana, A., Córdova R., M., & Guzman-Rivero, J. M. (2019). Antimoniato de Meglumine perilesional en leishmaniasis cutánea con falla terapéutica sistémica: serie de casos. *Gac. Med. Bol.*, 42(1), 74–78. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662019000100013&lng=es&nrm=iso%3E. (accedido en 21 09 2019)
- Rojas, E., Limachi Choque, J., & Guzman-Rivero, M. (2021). Combined Treatment in Cutaneous Leishmaniasis with Therapeutic Failure. *Gaceta Medica Boliviana*, 44(2), 260–264. <https://doi.org/10.47993/GMB.V44I2.292>

- Rojas, E., Parrado, R., Delgado, R., Reithinger, R., & Garcia, A. L. (2009). Leishmaniasis in Chaparé, Bolivia [letter]. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 678–680.
<https://doi.org/10.1002/hep.22184>
- Rojas, E., Paz, D., Verduguez-Orellana, A., Cordova R., M., & Guzman R., J. M. (2017). Tratamiento combinado de Leishmaniasis mucosa posterior a falla terapéutica con tratamiento convencional: reporte de caso clínico. *Gac. Med. Bol.*, 40(1), 46–48
- Ruiz-Postigo, J. A., Jain, S., Madjou, S., Maia-Elkhoury, A. N., Valadas, S., Warusavithana, S., Osman, M., Yajima, A., Lin, Z., Beshah, A., Kim, S. (2022). Global leishmaniasis surveillance: 2021, assessing the impact of the COVID-19 pandemic. *Weekly Epidemiological Record*, 45(45), 575–590. Retrieved from
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/364349/WER9745-eng-fre.pdf>
- Sánchez, E., Maritza, N., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Con-Ciencia*, 2(1), 125–138. Retrieved from
http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rcfb/v2n1/v2n1_a14.pdf
- Sandoval, A., & Minaya, G. (2011). Leishmaniosis tegumentaria, una mirada a una “enfermedad tropical de satendida.” *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(3), 560–563. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.283.540>
- Schonian, G., Kuhls, K., & Mauricio, I. L. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*, 138(4), 405–425. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001538>
- Schönian, G., Mauricio, I., Gramiccia, M., Cañavate, C., Boelaert, M., & Dujardin, J. C. (2008). Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends in Parasitology*, 24(3), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.006>
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D. F. H., Presber, W., & Jaffe, C. L. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(1), 349–358. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)

- Schuster, F. L., & Sullivan, J. J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 15, pp. 374–389. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.374-389.2002>
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., Scola, B. La, Fournier, P. E., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Shaw, J. J. (2020). Una breve historia de las Leishmaniasis en las Américas. In Atlas interactivo de Leishmaniasis en las Américas Aspectos clínicos. y diagnósticos diferenciales (pp. 1–582). Retrieved from <https://www.paho.org/es/documentos/atlas-interactivo-leishmaniasis-americas-aspectos-clinicos-diagnosticos-diferenciales>
- Silveira, F. T., Ishikawa, E. A. Y., De Souza, A. A. A., & Lainson, R. (2002). An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*, 9(1), 43–50. <https://doi.org/10.1051/parasite/200209143>
- Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, 123(3), 311–330.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6(791), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Soto, J., Tolado, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gómez, A., Molleda, F., Fuentelsaz, C., Anders, G., Sindermann, H., Engel, J., Berman, J. (2007). Treatment of bolivian mucosal leishmaniasis with Miltefosine. *Clinical Infectious Diseases*, 44(3), 350–356. <https://doi.org/10.1086/510588>
- Sundar, S., Thakur, B. B., Tandon, A. K., Agrawal, N. R., Mishra, C. P., Mahaptra, T. M., & Singh, V. P. (1994). Clinicoepidemiological study of drug resistance in Indian kala - azar. *BMJ*, 308(6924), 307. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6924.307>

- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9), 170165. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Takagi, H., Itoh, M., Islam, M. Z., Razzaque, A., Ekram, A. R. M. S., Hashighuchi, Y., Noiri, E., Kimura, E. (2009). Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 578–582. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0145>
- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C. F., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F. P., & de Souza, W. (2013). The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathogens*, 9(10), 6–10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003594>
- Telleria, J., Bosseno, M., Tarifa, T., Buitrago, R., Martinez, E., Torrez, M., Le Pont, F., Brenière, S. (1999). Putative Reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a Sub-andean Focus of Bolivia Identified by kDNA-Polymerase Chain Reaction. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(1), 5–6. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000100002>
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J. A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., & Serres, E. (1993). Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, 68(2), 104–106.
- Toledo, A., Martín-Sánchez, J., Pesson, B., Sanchiz-Marín, C., & Morillas-Márquez, F. (2002). Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 119(2), 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00424-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00424-8)
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: A review. *F1000Research*, 6, 1–15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- Torrez-Espejo, J., Pratlong, F., Le Pont, F., Mouchet, J., Desjeux, P., & Riux, J.-A. (1989). Leishmaniasis in Bolivia. V. Human strains of *Leishmania (V.) braziliensis* from the departament of Pando. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84(4), 583. Retrieved from <https://www.scielo.br/j/mioc/a/nhKqsJYL98Mbh8BmNyPPBgR/?format=pdf&lang=en>

- Torrico, F., Parrado, R., Castro, R., Marquez, C. J., Torrico, M. C., Solano, M., Reithinger, R., García, A.L., Rojas, E., Delgado, R. (2009). Case report: Co-infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and HIV: Report of a case of mucosal leishmaniasis in Cochabamba, Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(4), 555–558. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0268>
- Torrico, M., & Zubieta, M. (2010). Manual de normas y procedimientos técnicos de laboratorio (para Leishmaniasis). Serie de Documentos Técnicos. La Paz: Ministerio de Salud y Deportes.
- Tsukayama, P., Lucas, C., & Bacon, D. J. (2009). Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 39(3), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.004>
- Urjel, R., Recacoechea, M., Desjeux, P., Bermudez, H., Villaroel, G., Balderrama, S., Carrasco, J., Aguilar, O., Dujardin, J.C., Le Ray, D. (1987). Leishmaniosis en los Llanos de Bolivia VI: Caracterización preliminar de once aislados de *Leishmania*. *Bol Científico Centro Enfermedades Trop*; 13: 38–44.
- Valdivia, H. O., De Los Santos, M. B., Fernandez, R., Christian Baldeviano, G., Zorrilla, V. O., Vera, H., Lucas, C.M., Edgel, K.A., Lescano, A.G., Mundal, K.D., F Graf, P. C. (2012). Natural *Leishmania* Infection of *Lutzomyia auraensis* in Madre de Dios, Peru, Detected by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 87(3), 511–517. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0708>
- Valdivia, H. O., Reis-Cunha, J. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Baptista, R. P., Baldeviano, G. C., Gerbasi, R. V., Dobson, D.E., Pratlong, F., Bastien, P., Lescano, A.G., Beverley, S.M., Bartholomeu, D. C. (2015). Comparative genomic analysis of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *BMC Genomics*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1928-z>
- Valero, N. N. H., & Uriarte, M. (2020). Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitology Research*, 119(2), 365–384. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06575-5>

- Van den Broeck, F., Savill, N.J., Imamura, H., Sanders, M., Maes, I., Cooper, S., Mateus, D., Jara, M., Aduai, V., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Garcia, L., Cupolillo, E., Miles, M., Berriman, M., Schnauffer, A., Cotton, J.A., Dujardin, J.C. (2020). Ecological divergence and hybridization of Neotropical *Leishmania* parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(40), 25159–25168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920136117>
- Van der Auwera, G., & Dujardin, J.-C. (2015). Species Typing in Dermal Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>
- Van der auwera, G., Maes, I., De Doncker, S., Ravel, C., Cnops, L., Van Esbroeck, M., Van Gompel, A., Clerinx, J., Dujardin, J. (2013). Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in european tropical infectious disease clinics. *Euro Surveillance*, 18(30), 20543. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20543>
- Van der Auwera, G., Ravel, C., Verweij, J., Bart, A., Schoñian, G., & Felger, I. (2014). Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 1098–1104. <https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13>
- Van der Snoek, E. M., Lammers, A. M., Kortbeek, L. M., Roelfsema, J. H., Bart, A., & Jaspers, C. A. J. J. (2009). Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. *Clinical and Experimental Dermatology*, 34(8), e889–e891. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03658.x>
- Vargas Martínez, F., Torres Guerrero, E., Arenas, R., & Quintanilla Cedillo, M. R. (2011). Leishmaniasis en México. *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana*, 39(4), 163–183.
- Vélez, L. J. D., & Carrillo, C. D. C. (2013). Cutaneous leishmaniasis and liposomal amphotericin B. Case report. *Infectio*, 17(4), 201–204. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(13\)70732-x](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(13)70732-x)
- Viana de Almeida, L., Luís Reis-Cunha, J., Coqueiro-dos-Santos, A., Flávia Rodrigues-Luís, G., de Paula Baptista, R., de Oliveira Silva, S., Norma de Melo, M., Castanheira Bartholomeu, D. (2021). Comparative genomics of *Leishmania* isolates from Brazil confirms the presence of *Leishmania major* in the Americas. *International Journal for Parasitology*, 51(12), 1047–1057. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.05.009>

- Victoir, K., Bañuls, A. L., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Hamers, R., Noël, S., De Doncker, S., Le Ray, D., Tibayrenc, M., Dujardin, J. C. (1998). The *gp63* gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology*, 117(1), 1–13. <https://doi.org/10.1017/s0031182098002789>
- Villarreal Julio, R. G., Herrera, G., & Muskus López, C. E. (2021). Identificación de especies de *Leishmania* mediante PCR en tiempo real acoplada a curvas de fusión de alta resolución. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 73(3), 1–21. Retrieved from <https://orcid.org/0000-0002-9009-1086>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC307397/pdf/nar00021-0189.pdf>
- Weigle, K. A., de Davalos, M., Heredia, P., Molineros, R., Saravia, N. G., & D'Alessandro, A. (1987). Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods [Article]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(3), 489–496. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.489>
- World Health Organization. (2022). Operational manual on leishmaniasis vector control, surveillance, monitoring and evaluation. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060340>
- WHO, 2022a. <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-cases-of-cutaneous-leishmaniasis-reported>
- WHO, 2022b. (<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-cases-of-visceral-leishmaniasis-reported>)
- WHO, (2023a). (https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_cl_2021d2cc44b7-4950-41ec-975e-44897d3676b7.png?sfvrsn=19fff3ca_3)
- WHO, (2023b). (https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_vl_2021e2ccf4cc-dd58-471b-876b-d011047d3fd6.png?sfvrsn=caadc6a5_3)

- Wortmann, G., Hochberg, L., Houg, H.-H., Sweeney, C., Zapor, M., Aronson, N., Weina, P., Ockenhouse, C. F. (2005). Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. Retrieved from <http://www.ajtmh.org/docserver/fulltext/14761645/73/6/0730999.pdf?expires=1555539556&id=id&accname=guest&checksum=21854A02EA573FD44A8234F09A1E8E98>
- Yao, C., Donelson, J. E., & Wilson, M. E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 132(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00211-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00211-1)
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., & Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), 781–791. <https://doi.org/10.1038/nrm1492>
- Zárate, M., Romano, V., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2014). Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 98–102. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70055-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70055-0)
- Zemanová, E., Jirků, M., Mauricio, I. L., Horák, A., Miles, M. A., & Lukeš, J. (2007). The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *International Journal for Parasitology*, 37(2), 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.008>
- Zorrilla, V., Vásquez, G., Espada, L., & Ramírez, P. (2017). Vectores de la leishmaniasis tegumentaria y la Enfermedad de Carrión en el Perú: una actualización. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(3), 485. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2398>.